

STRUKTUR-FUNKTIONS-BEZIEHUNG VIRALER KALIUMKANÄLE

Einfluss der Transmembrandomänen auf die Funktion und Sortierung von Kaliumkanälen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Dirk Baumeister

aus Wesel

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Adam Bertl

Eingereicht am 20.04.2010

Mündliche Prüfung am 04.06.2010

Darmstadt 2010

D17



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung Teil 1 – Verlängerung der TM1 von Kcv.....	1
1.1. Ionenkanäle	1
1.1.1. Bedeutung von Ionenkanälen für zelluläre Prozesse	1
1.1.2. Aufgabe und Funktionsweise von Ionenkanälen	1
1.2. Kaliumkanäle	2
1.2.1. Struktur von Kaliumkanälen	2
1.2.2. Funktion von Kaliumkanälen	5
1.3. Der virale Kaliumkanal Kcv	9
1.3.1. PBCV-1	9
1.3.2. Die Struktur von Kcv	11
1.3.3. Struktur-Funktionsanalysen von Kcv	12
1.4. Lipid-Protein-Interaktionen.....	14
1.4.1. Interaktion von Transmembranhelices mit den umgebenden Lipiden.....	14
1.5. Zielsetzung – Teil1	18
2. Ergebnisse - Teil 1.....	19
2.1. Heterologe Expression von Kcv in HEK293-Zellen.....	19
2.1.1. Expression von Kcv in HEK293-Zellen.....	19
2.1.2. Inhibition durch Cholinchlorid.....	21
2.2. Verlängerung der TM1	26
2.2.1. Insertion eines Alanins an Position 32 (Kcv-A32)	26
2.2.2. Insertionen eines Alanins an den Positionen 30-14 der TM1	29
2.2.3. Charakterisierung der Mutanten, die einen träge aktivierenden Einwärtsstrom generieren (Kcv-A17-A14)	35
2.3. Temperaturabhängigkeit der Kanalaktivität	47
2.3.1. Temperaturabhängigkeit der Kcv-A17-Mutante	48
2.3.2. Temperaturabhängigkeit von Kcv-wt	59
3. Diskussion – Teil1	65
3.1. Schnelles und langsames <i>Gating</i> sind zwei unabhängige Prozesse	66
3.1.1. Der langsame <i>Gating</i> -Prozess kann in HEK293-Zellen reaktiviert werden	67
3.1.2. Die Verlängerung der ersten Transmembrandomäne von Kcv induziert positionsabhängige Veränderungen	67
3.1.3. Funktion des C-terminalen Abschnitts der TM1.....	68

3.2	Salzbrücken bilden die molekulare Grundlage des langsamen <i>Gatings</i> von Kcv	71
3.1.1	Eine Verlängerung der TM1 von Kcv beeinflusst die Salzbrückenformierung, die das langsame <i>Gate</i> öffnet	72
4	Einleitung Teil 2 – Duales <i>Targeting</i> / Hefekomplementation	78
4.1	Modelleigenschaften viraler Proteine	78
4.1.1	Aufklärung zellbiologischer Abläufe mit viralen Proteinen	78
4.1.2	Der virale Kaliumkanal Kcsv	78
4.1.3	Intrazelluläre Sortierung von Proteinen	79
4.1.4	Duales <i>Targeting</i> von Kcv und Kcsv	79
4.2	Hefekomplementation	81
4.2.1	Heterologe Expression von Kanalproteinen	81
4.2.2	Die Methode der Hefekomplementation	82
4.2.2.1	Die Hefe	82
4.2.2.2	Der Kaliumhaushalt der Hefen	83
4.2.2.3	Wachstum der Hefen bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen	85
4.2.2.4	Hefe-Komplementationstest	86
4.3	Versuchsziel	87
5	Ergebnisse & Diskussion – Teil 2	88
5.1	<i>Directed Evolution</i>	88
5.1.1	<i>Randomized site directed PCR</i>	88
5.1.2	Transformation in Hefe und <i>Replica Plating</i>	90
5.1.3	Sequenzanalyse	92
6	Zusammenfassung	96
7	Material und Methoden	98
7.1	Material	98
7.1.1	Chemikalien	98
7.1.2	Enzyme	98
7.1.3	Größenstandards für die Gelelektrophorese	98
7.1.4	Reaktionssysteme (Kits)	99
7.1.5	Oligonukleotide	99
7.1.6	Plasmide	100
7.1.7	Organismen	103
7.1.7.1	Prokaryotische Organismen	103
7.1.7.2	Eukaryotische Organismen	103
7.1.8	Geräte	104

7.1.9	Medien & Lösungen	104
7.2	Molekularbiologische Methoden	109
7.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	109
7.2.2	Ligation	110
7.2.3	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	111
7.2.4	Plasmidpräparationen	111
7.2.5	DNA-Aufreinigung.....	111
7.2.6	Gelelektrophorese	111
7.2.7	Quantifizierung der DNA-Proben	112
7.2.8	DNA-Sequenzierung	112
7.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	112
7.3.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	112
7.3.2	Hitze-Schock-Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	113
7.4	Zellkultur.....	113
7.4.1	Zellkulturführung.....	113
7.4.2	Transfektion von HEK293-Zellen	114
7.5	Kultivierung von Hefezellen.....	114
7.5.1	Herstellung einer Hefe-Vorkultur.....	115
7.5.2	Herstellung kompetenter Hefen mit der LiAc-Methode	115
7.5.3	Transformation der Hefen mit der LiAc-Methode	115
7.5.4	Herstellung kompetenter Hefen mit dem Frozen-EZ Yeast Transformation Kit™ (Zymo Research; Orange, USA).....	116
7.5.5	Transformation kompetenter Hefen mit dem <i>Frozen-EZ Yeast Transformation Kit</i> ™ (Zymo Research; Orange, USA)	116
7.5.6	Hefekomplementationstest	117
7.5.7	<i>Replica Plating</i>	117
7.5.8	Zymolyase-Verdau von Hefezellen.....	118
7.6	<i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	118
7.7	Sterilität	119
7.8	Software und Internetadressen	119
8	Referenzen	121
9	Danksagung	126
10	Eidesstattliche Erklärung	127
11	Anhang.....	128

1. Einleitung Teil 1 – Verlängerung der TM1 von Kcv

1.1. Ionenkanäle

1.1.1. Bedeutung von Ionenkanälen für zelluläre Prozesse

Die Funktion von Ionenkanälen ist für zahlreiche zelluläre Prozesse essentiell und spielt sowohl in der biologischen, als auch in der medizinischen Forschung eine immer wichtigere Rolle. Ionenkanäle sind Schlüsselemente bei zahlreichen fundamentalen Lebensprozessen und Fehler in ihren Funktionen Ursache für unterschiedlichste Krankheiten. Herzmuskelarrhythmie, Diabetes, Bluthochdruck, Asthma, Migräne, multiple Sklerose, Angina pectoris und Epilepsie sind nur einige namhafte Beispiele für Krankheiten, die durch den Ausfall oder Defekte von Ionenkanälen, so genannte Channelopathien, hervorgerufen werden (Ashcroft, 2000). Aber auch bei zahlreichen pathogenen Virusbefällen, wie Influenza oder HIV, kommt den Ionenkanälen eine Schlüsselrolle zu. Daher gilt es, die Funktionsweise und die grundlegenden Regulationsmöglichkeiten von Ionenkanälen zu untersuchen und zu verstehen.

1.1.2. Aufgabe und Funktionsweise von Ionenkanälen

Ionenkanäle sind auf den Transport von anorganischen Ionen spezialisierte Proteine, die sich öffnen und schließen können und auf diese Weise den selektiven Durchtritt von Ionen über eine Biomembran kontrollieren. Die Lipid-Doppelschicht einer solchen Membran stellt eine große energetische Barriere dar. Die Energie für den Ionen-Transport über eine Membran wird von ca. $50 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ durch die Aktivität von Ionenkanälen auf $2\text{-}3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ herabgesetzt (Parsegian, 1969; Berneche und Roux, 2001). Dabei bilden diese integralen Membranproteine in ihrer Mitte eine wassergefüllte Pore aus, welche die Lipid-Doppelschicht von biologischen Membranen durchspannt. Auf diese Weise wird es Ionen von geeigneter Größe und Ladung ermöglicht, entsprechend des jeweiligen elektrochemischen Gradienten, die Membran zu passieren. Dieser Prozess ist, im Gegensatz zu dem aktiven Transport über Ionenpumpen, passiv, das heißt, es muss keinerlei Energie aufgewandt werden. Dabei ist zu beachten, dass die Transportgeschwindigkeit durch Ionenkanäle beinahe der freien Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser entsprechen kann (Hille, 2001). Zellen aller Lebensformen und ihre Organellen sind von einer Lipidmembran umgeben, daher ist die Funktion von Ionenkanälen für zahlreiche Zellfunktionen essentiell. Als Beispiel für die weit gefächerte Beteiligung von Ionenkanälen sei hier exemplarisch die Kontraktion des Herzmuskels, die Signalübertragung von Nervenzellen, die Osmoregulation, die Insulinausschüttung im Pankreas, die Signaltransduktion aber auch die Form und Dauer von Aktionspotentialen genannt (Ashcroft, 2000).

Ionenkanäle werden häufig nach ihrer spezifischen Selektivität für eine bestimmte Ionensorte eingeteilt. Dabei gilt: je ausgeprägter die Selektivität, desto geringer ist die Leitfähigkeit der geöffneten Pore für andere Ionen.

1.2. Kaliumkanäle

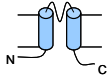
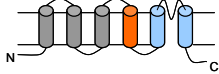
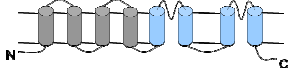
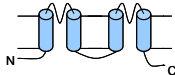

1.2.1. Struktur von Kaliumkanälen

Kaliumkanäle sind integrale Membranproteine, die mit hoher Selektivität den Durchtritt von K^+ -Ionen durch die Membran katalysieren. Dabei haben sie, wie der Name schon sagt, eine relativ hohe Selektivität für Kalium gegenüber anderen Kationen. So kann die Selektivität von Kalium gegenüber Natrium beispielsweise zwischen 10:1 und 10000:1 schwanken (Hille, 2001).

Da Kaliumkanäle in vermutlich allen Lebensformen existieren und wie oben bereits erwähnt an zahlreichen essentiellen Zellfunktionen beteiligt sind, gibt es eine Vielzahl von Kaliumkanal-Typen, die in verschiedene Kanal-Familien klassifiziert werden können. In der Tabelle 1.1 ist eine Übersicht der bekanntesten Strukturtypen und Kanalfamilien von Kaliumkanälen zusammengestellt.

Tabelle1.1: Strukturtypen und Kanalfamilien (Hertel 2005, Dissertation)

K⁺-Kanäle können, je nach Anzahl ihrer transmembranen Helices pro Untereinheit, in unterschiedliche Familien eingeteilt werden.

Kaliumkanal	Beispiel	Organismus
2TM-Typ		
		
Kir (inward rectifier)	KirBac1.1 Kir6.2	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Homo sapiens</i>
Kanalhomologe aus Prokaryoten	KcsA MthK	<i>Streptomyces lividans</i> <i>M. thermoautotrophicum</i>
Kanalhomologe aus Algenviren	Kcv Kev	Chlorellavirus PBCV-1 Ectocarpusvirus EsV-1
6TM-Typ		
		
Kv (Shaker-Typ)	Shaker (Kv1)	<i>Drosophila melanogaster</i>
EAG (ether-à-gogo)	EAG hERG	<i>Caenorhabditis elegans</i> <i>H. sapiens</i>
Slo (BK-Kanäle)	mSlo	<i>H. sapiens</i>
HCN (Hyperpolarisations-aktivierte, Cyclo-Nucleotid-gesteuerte Kanäle)	HCN2	<i>H. sapiens</i>
pflanzliche K ⁺ -Kanäle	KAT1 AKT1	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>A. thaliana</i>
Tandem-Kanäle		
6TM+2TM-Motiv	Tok1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		
2x 2TM-Motiv	Cetk1	<i>C. elegans</i>
		
Virale Ionenkanäle		
(1TM)	M2 Vpu	Influenzavirus A HIV-1
		

Trotz dieser hohen Diversität weist die Kernstruktur aller Kaliumkanäle ein hohes Maß an struktureller Konservierung auf. So besteht ein funktioneller Kaliumkanal in der Regel aus vier Untereinheiten, die sich zu einem Tetramer-Komplex zusammenlagern. Die Untereinheiten sind symmetrisch angeordnet und bilden in ihrem Zentrum eine wassergefüllte Pore aus (Abb. 1.1a) (MacKinnon, 1991; Doyle *et al.*, 1998; MacKinnon *et al.* 2001). Alle Typen von Kalium-Kanal-Untereinheiten bestehen aus einem homologen Kern von zwei Transmembrandomänen (TM), die durch die Porendomäne, auch Porenloop (P) genannt, verbunden sind (Abb. 1.1b). Durch die Zusammenlagerung der vier Porendomänen im Zentrum des Ionen-Kanals entsteht der eigentliche Kanal, den die Ionen passieren können. Durch die Porengröße und durch Strukturen in der Pore, die sehr spezifische Wechselwirkungen mit der jeweiligen Ionenart eingehen (Permeation s.u.), erhält der Kanal seine spezifische Ionenselektivität. Somit bildet die Porendomäne eine Art Selektivitätsfilter aus (Miller 1992, Jan und Jan 1992). Dieser Selektivitätsfilter enthält eine hoch konservierte Abfolge aus 8 Aminosäuren: –TXXTXGY/FG–. Dieses Aminosäure-Motiv weisen alle bisher klonierten Kalium-Kanäle aus sowohl Eukaryoten und Prokaryoten als auch aus bestimmten Viren auf. Man spricht von der so genannten „signature-sequence“ (Abb.1.1c).

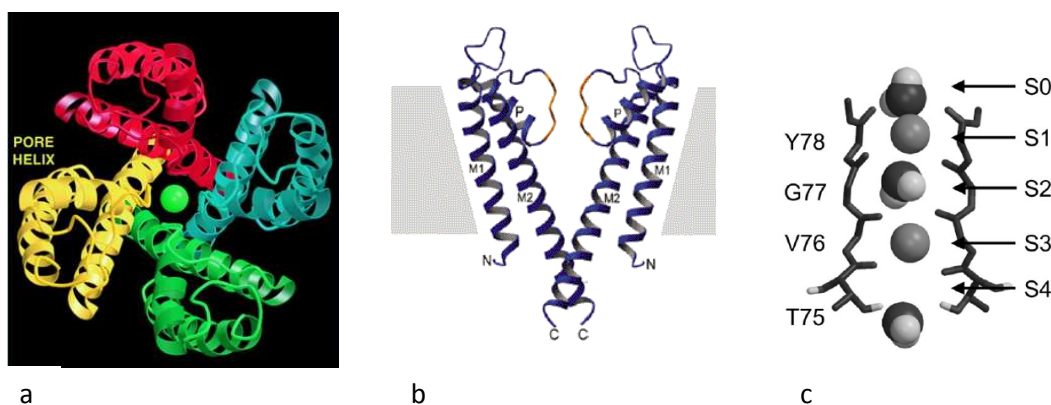


Abb.1.1: Strukturelemente eines Kaliumkanals am Beispiel von KcsA

(a) Aufsicht auf die extrazelluläre Seite des bakteriellen Kaliumkanals KcsA. Die einzelnen Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die grüne Kugel im Zentrum der Pore repräsentiert ein Kalium-Ion. (Doyle *et al.*, 1998); (b) Seitenansicht des KcsA-Kanals. In dieser Darstellung sind zwei von vier Proteinuntereinheiten dargestellt. Die Transmembranhelices (M1 und M2) sind als Bänder dargestellt und durch den Porenloop (P) miteinander verbunden (Jiang *et al.*, 2002a); (c) Abbildung des Kalium-Kanal-Selektivitätsfilters. Die schematische Darstellung zeigt eine Konstellation von Ionen und Wasser im Selektivitätsfilter (Shrivastava *et al.*, 2002).

Eine Untereinheit eines solchen Kalium-Kanals besteht also im einfachsten Fall aus der Abfolge TM1-P-TM2. Diese Architektur weisen beispielsweise die eukaryotischen Kir-Kanäle (Kubo *et al.*, 1992) oder die bakteriellen Kalium-Kanäle KirBac1.1 aus *Burkholderia pseudomallei* (Kuo *et al.*, 2003) und KcsA aus *Streptomyces lividans* auf. Der KcsA-Kanal war auch der erste Kaliumkanal, dessen Kristallstruktur erfolgreich aufgeklärt werden konnte (Abb. 1.1)(Doyle *et al.*, 1998).

Allerdings kann die Anzahl der Transmembrandomänen variieren, was auch als Klassifizierungsmerkmal genutzt wird (Tabelle 1.1). Dementsprechend komplizierter aufgebaut sind die Kv-Kanäle (*voltage gated*). Diese besitzen vier zusätzliche TM-Domänen (6TM-Motiv), wobei sich die Porendomäne zwischen den TM5 und TM6 befindet. Zu diesem Strukturtyp gehören u.a. die tierischen Kanäle der *Shaker*-Familie oder die pflanzlichen Kanäle AKT1 (*Arabidopsis* K⁺ transporter1) (Sentenac *et al.*, 1992) und KAT1 (Kalium *Arabidopsis thaliana* channel1) (Anderson *et al.*, 1992). Diese Kanäle besitzen zahlreiche positiv geladene Aminosäuren in der vierten Transmembrandomäne (S4-Helix), die eine Art Spannungssensor darstellen, wodurch die spannungsabhängige Aktivierung bzw. Inaktivierung vermittelt wird.

Als dritter Strukturtyp für Kaliumkanäle ist die Unterfamilie der Tandem-Kanäle zu nennen, bei denen ein Monomer zwei Porendomänen besitzt. So ist z.B. im Cctk 1.3 (*Caenorhabditis elegans*) das 2TM-Motiv verdoppelt (Goldstein *et al.*, 1996). In diesem Fall kann ein funktioneller Kanal bereits aus zwei Untereinheiten gebildet werden. Gleiches gilt für den Tok1-Kanal (Two-domain outward rectifier K⁺ channel) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Bei diesem Strukturtyp wird jedoch ein 6TM-Motiv mit einem 2TM-Motiv gekoppelt (Ketchum *et al.*, 1995).

1.2.2. Funktion von Kaliumkanälen

Mit der Darstellung der inneren Oberfläche des KcsA-Kanals werden drei wichtige Elemente deutlich sichtbar (Abb. 1.3):

- die Filterregion (F) mit der „signature sequence“
- die Cavität (C)
- das *Gate* (G)

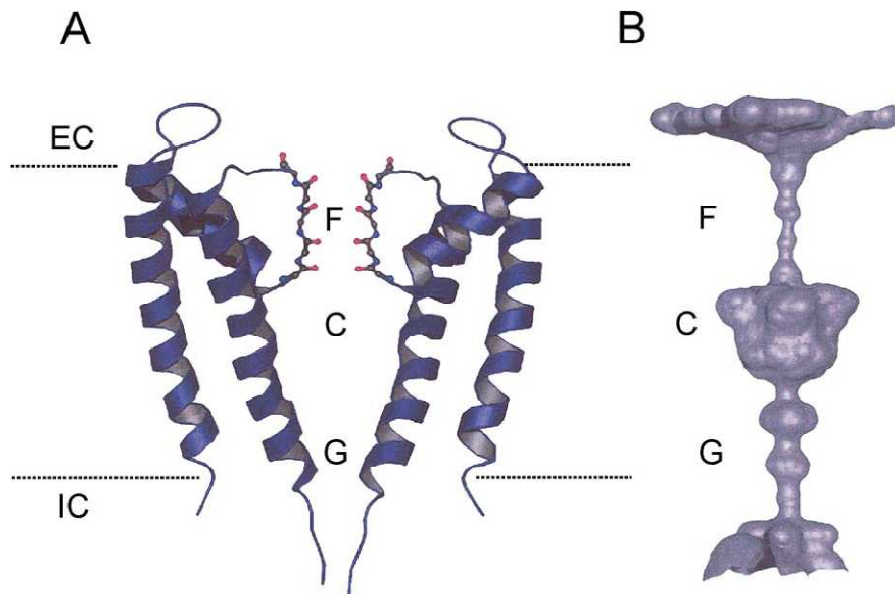


Abb.1.3: Innere Oberfläche des KcsA-Kanals mit Filterregion, Cavität und Gate

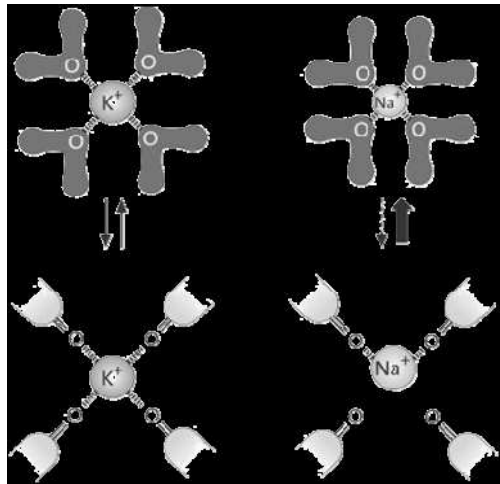
(A) Seitenansicht von zwei Proteinuntereinheiten des KcsA-Kanals. Die Grenzflächen der Lipiddoppelmembran sind durch unterbrochene Linien angedeutet (EC=extrazelluläre Seite; IC=intrazelluläre Seite). (B) Schematische Darstellung der inneren Oberfläche des Kanals mit Filterregion (F), Cavität (C) und dem Gate (G) (Sansom *et al.*, 2002).

Dabei basieren die funktionellen Eigenschaften von Kaliumkanälen auf 2 fundamentalen Prozessen: Der Permeation und dem *Gating*.

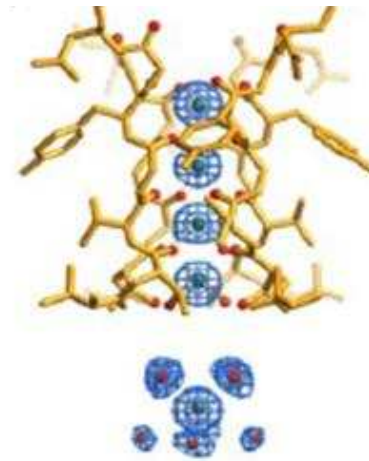
Permeation

Als Permeation bezeichnet man den selektiven und effizienten Transport der Kaliumionen über die Membran. Entscheidendes Element für die Permeation ist der Selektivitätsfilter (F). Nach der heute verbreiteten Annahme ist dessen Funktion das Abstreifen der Hydrathülle der Kalium-Ionen. Dabei werden die Carbonyl-Sauerstoffatome des Polypeptid-Rückgrats exakt so ausgerichtet, dass sie die Rolle der Sauerstoffe aus den Wassermolekülen der Hydrathülle übernehmen können (Zhou *et al.*, 2001). Auf diese Weise entstehen energetisch stabilisierte Positionen für die permeierenden Kaliumionen im Filter (Abb. 1.4b). Nur durch diesen eleganten Trick ist es möglich einen selektiven Transport von Ionen über eine Membran zu katalysieren, ohne Energie aufwenden zu müssen. Wäre für die Permeation ein aktives Abstreifen der Hydrathülle nötig, müsste für jedes einzelne Kaliumion eine Energie von $325 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ aufgebracht werden. Daher ist diese Art der Permeation essentiell für die Funktionalität eines Kaliumkanals. Zudem kann nur auf diese Weise die Geschwindigkeit des Transportes auf dem Level der freien Diffusion gehalten werden.

Aufgrund dieser Eigenschaften sind beispielsweise Natrium-Ionen nicht in der Lage den Selektivitätsfilter zu passieren, obwohl sie einen geringeren Durchmesser als Kalium-Ionen aufweisen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Carbonyl-Sauerstoffatome des Polypeptid-Rückgrats zu weit auseinander liegen und somit nicht in der Lage sind die Hydrathülle für Natriumionen zu simulieren (Abb. 1.4a und 1.4b).



a



b

Abbildung 1.4: Modellvorstellung zur Permeation von Kaliumionen

(a) Die Kaliumionen streifen ihre Hydrathülle (oben links) ab und werden von den Carbonyl-Sauerstoffatomen des Filters (unten links) stabilisiert; dehydratisierte Natriumionen weisen einen zu geringen Durchmesser auf um von den Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen im Filter stabilisiert zu werden (unten rechts) (nach <http://www.wissenschaftonline.de>).

(b) Schematische Darstellung des Selektivitätsfilters. Im Bereich des Selektivitätsfilters sind vier Kalium-Ionen ohne Hydrathülle durch die Carbonyl-Sauerstoffatome stabilisiert und in der Cavität ist ein Kalium-Ion mit Hydrathülle zu erkennen (Zhou *et al.*, 2001).

Gating

Der Prozess des *Gatings* ist der Permeation übergeordnet und kontrolliert die zeitliche Koordination des Ionenflusses. Diese Kontrolle ist von großer Wichtigkeit für zahlreiche physiologische Prozesse. Dazu gehören Funktionen, wie oben bereits genannt, u.a. die Kontrolle des Herzschlages oder die Dauer bzw. Frequenz von Aktionspotentialen. Man unterscheidet zwei funktionelle Zustände von Ionenkanälen: offen und geschlossen (Neher und Sakmann, 1976). Befindet sich ein Kanal im geöffneten Zustand ist eine effiziente Ionenpermeation gewährleistet. Dagegen kann im geschlossenen Zustand kein Ionenfluss stattfinden. Beim Wechsel zwischen dem geöffneten Zustand und dem geschlossenen Zustand kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb des Kalium-Kanals (Abb.1.5). Allerdings ist der exakte molekulare Mechanismus, der dem *Gating* zugrunde liegt, noch nicht völlig aufgeklärt.

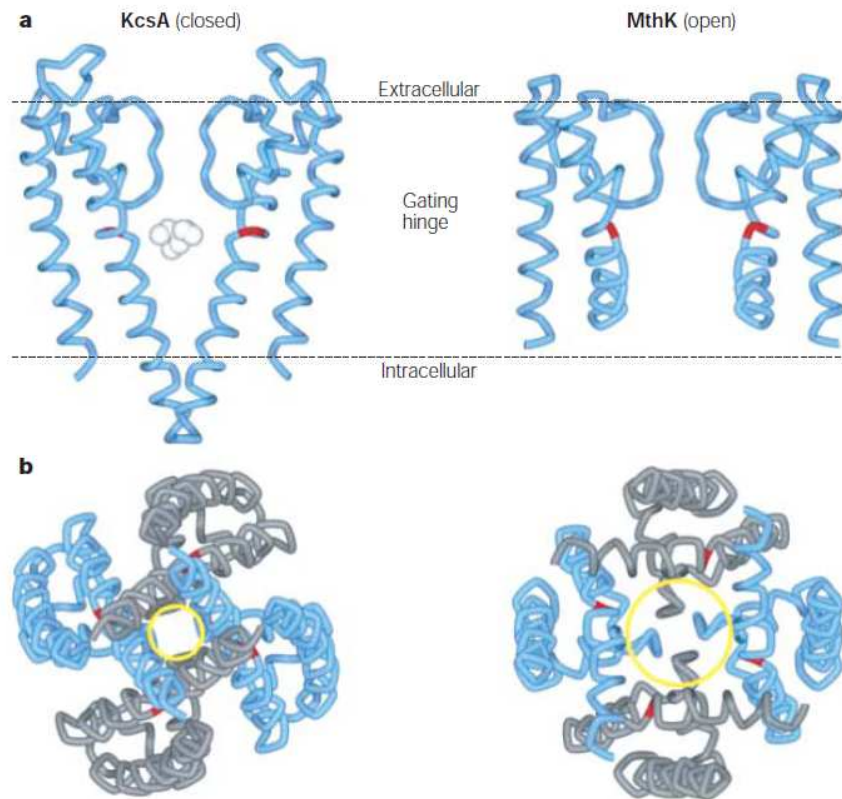


Abbildung 1.5: X-Ray-Strukturen des KcsA- und des MthK-Kanals

(a) Seitenansicht von je zwei Untereinheiten der Kanäle. Der rot markierte Bereich ist ein Glycinrest, der vermutlich in beiden Kanälen eine wichtige Rolle beim *Gating* spielt. (b) Aufsicht auf die tetramere Struktur beider Kanäle, wobei der gelbe Ring, die abweichenden Durchmesser der Pore im geöffneten und im geschlossenen Zustand aufzeigt (Swartz, 2004).

Die Struktur, die direkt an diesem Prozess beteiligt ist, wird als *Gate* bezeichnet. Über die Lage des oder der *Gates*, die den Permeationsweg öffnen und schließen, gibt es bisher 2 Hypothesen:

- i: Die lange Zeit vorherrschende Hypothese basiert auf Kristallstrukturen bakterieller Kanäle. Dabei wird durch das Überkreuzen der zweiten Transmembrandomäne (TM2) im Tetramer auf der cytosolischen Seite eine Engstelle erzeugt, die als *Gate* fungiert und als „*bundle crossing*“ bezeichnet wird (Doyle *et al.*, 1998) (Abb.5.1a).
- ii: Die zweite Hypothese diskutiert ein weiteres *Gate* im Selektivitätsfilter (Bichet *et al.*, 2004; VanDongen, 2004; Domene *et al.*, 2003; Hertel *et al.*, 2006; Schröder und Hansen 2007; Cordero-Morales *et al.*, 2007). Somit würde also der Selektivitätsfilter sowohl das *Gate* bilden, als auch die Permeation kontrollieren. So haben Punktmutationen im Selektivitätsfilter einen großen Einfluss auf die Stabilität des Offenzustandes (Zheng und Sigworth, 1997; Lu *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2010).

Grundsätzlich gilt jedoch, dass das *Gating* auf einer Konformationsänderung innerhalb des Kanalproteins basiert. Diese Konformationsänderung kann sowohl physikalisch z.B. durch mechanische Belastung oder Änderungen in der Membranspannung, aber auch biochemisch z.B.

durch Bindung eines Liganden, pH-Änderungen, Phosphorylierung oder Calcium-Ionen geregelt werden (Hille, 2001; Perozo *et al.*, 1999). Obwohl viele dieser Mechanismen weit entfernt vom eigentlichen *Gate* greifen, müssen sie jedoch entweder direkt oder indirekt mit dem *Gate* gekoppelt sein.

1.3. Der virale Kaliumkanal Kcv

Viruskodierte Proteine, die den Durchtritt von Ionen und kleineren Molekülen durch Membranen vermitteln, werden als Viroporine bezeichnet (Carrasco, 1995). Als Beispiele solcher Proteine können u.a. M2 aus dem Influenza A Virus oder Vpu aus dem Humanen Immundefizienz-Virus aber auch Kcv genannt werden. Der in diesem Teil der Arbeit untersuchte Kaliumkanal Kcv (**K**aliumkanal **C**hlorella **V**irus) stammt aus dem Virus PBCV-1 (*Paramecium bursaria Chlorella Virus-1*). Kcv ist das erste bekannte Protein, das einen funktionellen Kaliumkanal ausbildet, der aus einem Virus isoliert werden konnte und strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit eukaryotischen und prokaryotischen Kaliumkanälen aufweist (Plugge *et al.*, 2000).

1.3.1 PBCV-1

PBCV-1 gehört zur Familie der *Phycodnaviridae*. Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine eikosaedrische Morphologie (Abb.1.6a), eine interne Lipidmembran (Abb.1.6b) und ein großes doppelsträngiges und lineares DNA-Genom (180-560 kb) aus (Van Etten *et al.*, 2002). Diese Viren sind weltweit verbreitet und ihre Wirte sind eukaryotische Algen verschiedener Ordnungen. Nur Mitglieder der Gattung *Chlorovirus*, wie PBCV-1, infizieren Süßwasseralgen. Der Wirt von PBCV-1 ist die im Süßwasser lebende Grünalge *Chlorella NC64A*, die nur als Endosymbiont des Pantoffeltierchens *Paramecium bursaria* vorkommt (Abb.1.6c). Innerhalb dieser Symbiose ist eine Infektion der Alge mit PBCV-1 nicht möglich. Allerdings ist es gelungen die Algen in geeigneten Medien außerhalb von *Paramecium* zu ziehen und zu infizieren (Kawakami und Kawakami, 1978).

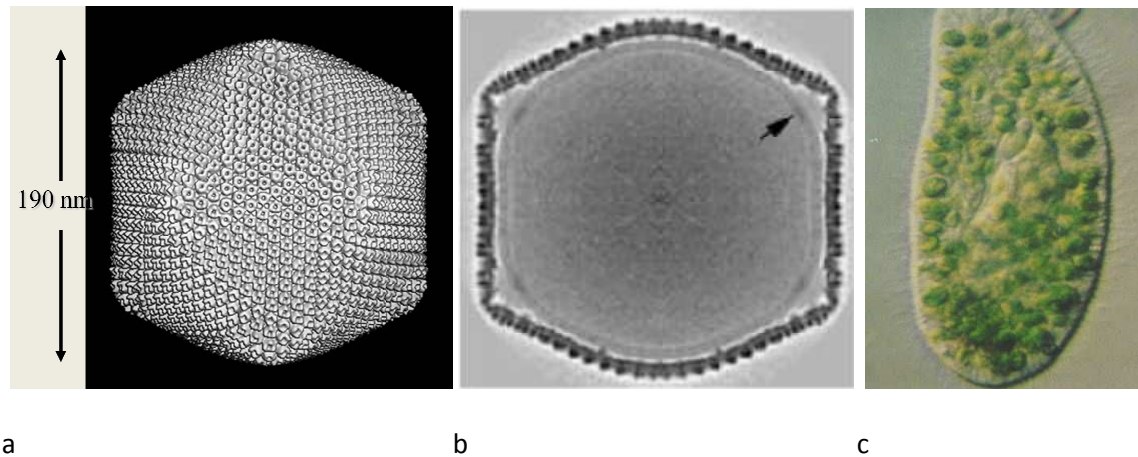


Abbildung 1.6: PBCV-1 und dessen Wirt *Paramecium bursaria*

(a) Modell des PBCV-1-Viruskapsids (Van Etten *et al.*, 2002). (b) Querschnitt durch eine 3-dimensionale Rekonstruktion des PBCV-1-Viruskapsids. Der Pfeil markiert die interne Virus-Membran (Van Etten *et al.*, 2002). (c) *Paramecium bursaria* mit NC64A-Chlorellen als Endosymbiont (<http://plantpath.unl.edu/facilities/Virology/intro.html>)

Der Lebenszyklus von PBCV-1 verläuft lytisch, d.h. jede infizierte Zelle stirbt nach erfolgter Virusvermehrung. Die physiologische Rolle von Kcv während der Infektion von PBCV-1 ist noch nicht genau geklärt. Allerdings gibt es deutliche Hinweise darauf, dass der Kaliumkanal für die Vermehrung des Chlorellavirus essentiell ist, da Kaliumkanalhemmstoffe, wie Barium oder Amantadin, nicht nur die Kanalaktivität hemmen, sondern in gleichem Maße auch die Replikation reduzieren (Plugge *et al.*, 2000). Diverse Untersuchungen zeigen, dass Kcv diese essentielle Funktion schon während der ersten Minuten der Infektion ausübt (Mehmel *et al.*, 2003). Zu Beginn der Infektion durch PBCV-1 erfolgt zunächst der Verdau der Zellwand gefolgt von einer turgorgetriebenen Fusion von Virusmembran mit der Plasmamembran der Wirtszelle. Durch diese Fusion kommt es zu einer Integration des Kcv-Kanals, der wahrscheinlich schon aktiv in der Virusmembran vorliegt, in die Plasmamembran der infizierten Zelle. Dies führt zu einer Depolarisation der Membran, gefolgt von einer Aktivierung weiterer Ionenkanäle, was schließlich zu einem Kaliumefflux und somit zu einem Turgor- und Volumenverlust führt (Frohns *et al.*, 2006; Neupärtl *et al.*, 2007).

Grundsätzlich scheinen Viroporine bei der Virusvermehrung eine ganz entscheidende Rolle zu spielen. Diese wichtige Funktion wurde aber erst in jüngster Vergangenheit erkannt. Somit bietet die Inhibition dieser Proteine ein großes Potential die Virusvermehrung zu reduzieren oder sogar komplett zu inhibieren. Beispiele solcher Proteine sind neben Kcv auch die oben bereits genannten Proteine M2 und Vpu aus den humanpathogenen HIV und Influenza Viren (Lamb and Pinto 1997).

1.3.2 Die Struktur von Kcv

Bei dem viralen Kaliumkanal Kcv handelt es sich im Vergleich zu anderen bisher bekannten Kaliumkanalproteinen um eine Art minimales Porenmodul. So besteht das gesamte Kcv-Monomer nur aus einer Porendomäne (P), die zwischen zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) lokalisiert ist, und einem kurzen cytoplasmatischen N-Terminus. Die Porendomäne hat eine Länge von 44 Aminosäuren und beinhaltet das Selektivitätsfiltermotiv GFG. Das Ende der zweiten Transmembrandomäne bildet den C-Terminus, so dass keinerlei C-terminaler cytoplasmatischer Überhang vorhanden ist (Kang *et al.*, 2004). Kcv ist mit einer Größe von insgesamt nur 94 Aminosäuren einer der kleinsten funktionellen Kaliumkanäle. Mit der Struktur TM1-P-TM2 stellt er das Kernmodul eines jeden Kaliumkanals dar (Abb.1.7).

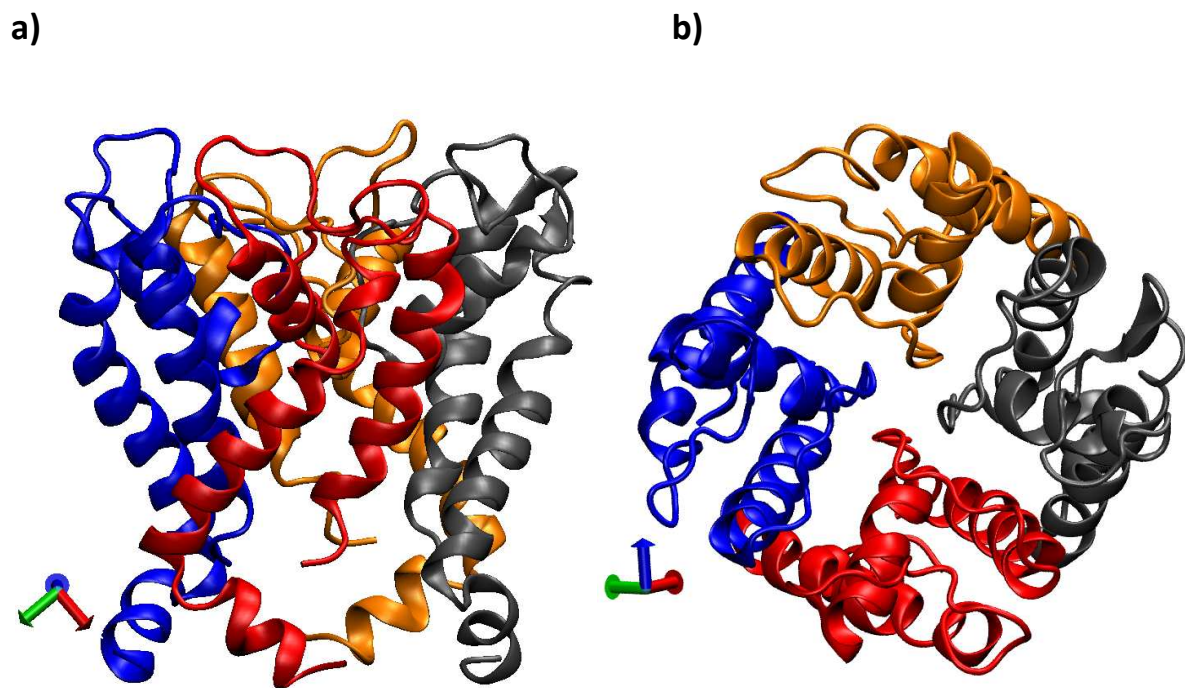


Abb.1.7: Homologiemodell des viralen Kaliumkanals Kcv

Die vier Proteinuntereinheiten sind in der Seitenansicht (a) und in der Aufsicht (b) gezeigt, wobei die Transmembranen-Helices und die Porenhelix als Band dargestellt sind. Die einzelnen Monomere sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. (zur Verfügung gestellt von Sascha Tayefeh).

1.3.3 Struktur-Funktionsanalysen von Kcv

Struktur-Funktionsanalysen untersuchen, wie der Name schon sagt, die grundlegenden Zusammenhänge von der Struktur eines Kanals auf der einen Seite und dessen Funktionsweise auf der anderen Seite. Allerdings sollte man beachten, dass mit steigender Größe eines Kanals sowohl dessen strukturelle Komplexität, als auch dessen Regulationsmöglichkeit stark zunimmt. Mit der Entdeckung des Kcv-Kanals ist es gelungen, einen funktionellen Kalium-Kanal zu isolieren, der quasi das Kernmodul eines jeden Kalium-Kanals darstellt. Auf diese Weise ist es möglich beliebige Veränderungen innerhalb einer AS-Sequenz zu untersuchen ohne spezifische Einflüsse umliegender regulatorischer Domänen berücksichtigen zu müssen.

Neben diesen strukturellen Vorteilen zeichnet sich Kcv durch weitere wichtige funktionelle Eigenschaften aus, die ihm Modellcharakter verleihen. So weist Kcv eine Spannungsabhängigkeit, eine Selektivität sowie eine Blockierbarkeit auf, die durchaus mit anderen weitaus komplexeren Kaliumkanälen vergleichbar ist. Zudem lassen sich Kcv und seine Mutanten im Gegensatz zu bakteriellen Kanälen leicht in heterologen Systemen, wie HEK-Zellen oder *Xenopus* Oozyten exprimieren (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002; Gazzarrini *et al.*, 2003; Hertel *et al.* 2006).

Die kaliumkanaltypische Selektivität von Kcv kommt durch die „signature sequence“ in der Porenregion zustande. Diese vermittelt eine Leitfähigkeit für bestimmte Ionen, die sich wie folgt charakterisieren lässt: $Rb^+ \geq K^+ > Cs^+ \gg Na^+ \gg Li^+$. Dass es sich bei der Porenregion um eine hochkonservierte Architektur handelt, erkennt man auch an dem Vorhandensein der beiden aromatischen Aminosäuren Tyrosin an Position 55 und Phenylalanin an Position 56. Diese Aminosäuren tragen dazu bei, die Pore in einer Konformation geöffnet zu halten, die den optimalen Durchfluss von Kaliumionen gewährleistet (Gazzarrini *et al.*, 2003).

Auch die Blockierbarkeit von Kcv ist mit weitaus komplexeren Kaliumkanälen vergleichbar. So ist Kcv beispielsweise durch Barium reversibel blockierbar. Dabei setzt sich das Bariumion spannungsabhängig in die Pore, verhindert die Permeation von weiteren Kaliumionen und unterbricht somit den Stromfluss (Gazzarrini *et al.*, 2003).

Eine Homologie-Modellierung von Kcv zur KirBac-1.1-Kristallstruktur verdeutlicht die strukturelle Ähnlichkeit und bestätigt das Vorhandensein von Elementen, wie Transmembrandomänen, Porenregion und Selektivitätsfilter (Tayefeh *et al.*, 2007). Zudem sagt das Homologie-Modell für den 12-AS langen N-Terminus eine helikale Struktur voraus, die parallel zur Cytoplasma-Membran-Grenzschicht verläuft. Diese molekulare Architektur scheint bei Kaliumkanälen des 2TM-Typs weit verbreitet zu sein, da auch die Kristallstruktur des KcsA-Kanals eine solche Domäne an der Membran-Wasser-Grenzschicht aufweist. Ein Entfernen dieses N-Terminus führt zu einem nicht funktionellen Kcv-Protein (Moroni *et al.*, 2002). Hertel *et al.* (2006) konnten in weiteren darauf aufbauenden Studien zeigen, dass das Prolin an Position 13 einen Knick in der helikalen Struktur des Proteins induziert, wodurch der N-Terminus strukturell von der TM1 separiert wird und eine sogenannte *slide-Helix* bildet (Abb.1.8). Zudem wurde erkannt, dass der N-Terminus eine kritische Länge aufweisen

muss, um weiterhin eine Leitfähigkeit zu gewährleisten. Verkürzt man den N-Terminus um mehr als 7 Aminosäuren kommt es zu einer drastischen Reduktion der Kanalfunktion. In jüngsten Untersuchungen zu Kcv wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Ausbildung von Salzbrücken zwischen der N-terminalen *slide*-Helix und dem C-Terminus des Kcv-Proteins am *Gating*-Prozess beteiligt ist (Hertel *et al.*, 2009). Kcv ähnelt in seiner Grundarchitektur dem bakteriellen KcsA-Kanal, für den, wie oben beschrieben, das „*bundle crossing*“ als pH-reguliertes inneres Gate angenommen wird. Allerdings sind die inneren Helices von Kcv zu kurz um ein „*bundle crossing*“ auszubilden (Tayefeh *et al.*, 2007). Durch Mutationsanalysen und MD-Simulationen konnte gezeigt werden, dass der negativ geladene C-Terminus des Proteins ein Kalium-Ion binden kann und somit den Permeationsweg durch den Kanal unterbindet. Durch eine Interaktion zwischen den Transmembrandomänen, die durch die Salzbrücken vermittelt wird, kann das Ion wieder aus der Bindung entlassen und damit der Permeationsweg freigegeben werden. In dieser Hypothese erfüllt der C-Terminus von Kcv die Rolle eines *Gates*. Die Salzbrückendynamik in dieser Region des Proteins könnte demnach den Austausch der Ionen von Cavität und Cytoplasma beeinflussen (Hertel *et al.*, 2009; Tayefeh *et al.*, 2007). Interessanterweise scheint auch das pH sensitive *Gate* von KcsA in einer ähnlichen Weise zu funktionieren; auch hier wird angenommen, dass die Interaktion zwischen innerer und äußerer Transmembrandomäne das „*bundle crossing*“ des Kanals beeinflusst.

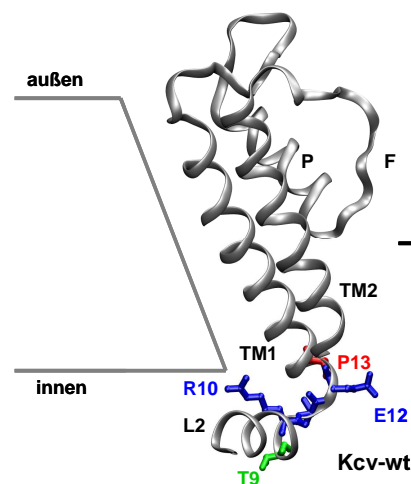


Abb.1.8: Strukturmodell von Kcv und dessen N-Terminus

Dargestellt ist eine von vier Proteinuntereinheiten in der Seitenansicht. Farblich markiert sind die Schlüsselaminosäuren des N-Terminus (TM=Transmembrandomäne; P=Porenregion; F= Filterregion). (Hertel 2005, Dissertation).

Trotz seiner minimalistischen Struktur weist der virale Kaliumkanal Kcv in verschiedenen Expressionssystemen eine charakteristische Spannungsabhängigkeit auf. Allerdings weisen die Stromantworten von Kcv-wt bei der Expression in menschlichen Zellen auf der einen Seite und die Stromantworten bei einer Expression in *Xenopus* Oozyten auf der anderen Seite gewisse Unterschiede auf (Moroni *et al.*, 2002; Gazzarrini *et al.*, 2003; Hertel *et al.* 2006). So zeigt Kcv bei der

Expression in *Xenopus* Oozyten bei negativen Spannungen eine zeitabhängige Aktivierung und bei positiven Spannungen werden die Kanäle träge inaktiviert. Diese Eigenschaften der Stromantwort findet man dagegen bei der Expression von Kcv in HEK293-Zellen nicht. So verläuft die Strom-Spannungskurve bei HEK293-Zellen in einem Bereich von -60 mV bis +20 mV weitgehend linear. Legt man jedoch negativere Spannungen an, kommt es zu einem deutlich ausgeprägten Abknicken der Kennlinie, was zu einer negativen Steigung der I/V-Kurve führt. Im Folgenden wird dies vereinfacht als negative Kennlinie bezeichnet. Zudem kommt es bei höheren negativen Spannungen im Gegensatz zur Expression von Kcv in *Xenopus* Oozyten zu einer schnellen zeitabhängigen Inaktivierung. Es existieren somit Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften von Kcv in den verschiedenen Expressionssystemen. Diese Unterschiede können verschiedener Herkunft sein. Einerseits könnte eine unterschiedliche Membrandicke in den verschiedenen Expressionssystemen einen Einfluss auf die Charakteristik der Stromantwort und somit auf die Funktionalität haben. Auch in anderen Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass unterschiedliche Expressionssysteme die Eigenschaften von Kanälen beeinflussen können (Petersen *et al.*, 1999). Dies kann einerseits an der Lipidzusammensetzung liegen, andererseits aber auch auf einen unterschiedlichen Durchmesser der Membran zurückzuführen sein. Nicht auszuschließen ist jedoch auch die Möglichkeit, dass die Unterschiede in der Kinetik von Kcv-wt dadurch zustande kommen können, dass in HEK293-Zellen ein Fusionsprotein aus Kcv und GFP transfiziert wird, um transfizierte Zellen von untransfizierten unterscheiden zu können. Im Gegensatz dazu wird in *Xenopus*-Oozyten kein Fusionsprotein mit GFP exprimiert.

1.4. Lipid-Protein-Interaktionen

1.4.1 Interaktion von Transmembranhelices mit den umgebenden Lipiden

Bei der Arbeit mit Ionenkanälen darf man nicht den Fehler machen und sich ausschließlich auf die strukturellen Merkmale des Kanalproteins und deren Funktion zu fokussieren. Bei Ionenkanälen handelt es sich wie oben ausführlich beschrieben um Transmembranproteine. Daher ist es wichtig, dass man den Kanal nicht isoliert betrachtet, denn auch die Umgebung, in der er seine Funktion erfüllen muss, ist von entscheidender Bedeutung. Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit dieser Thematik beschäftigt und konnten aufzeigen, dass die Interaktion von integralen Membranproteinen mit den umgebenden Lipiden einen großen Einfluss auf die Stabilisierung des Proteins und somit auf dessen Funktionalität ausübt (Yau *et al.*, 1998; Killian 2003; Domene *et al.*, 2003).

Grundsätzlich bilden transmembrane Proteinsegmente strukturell α -Helices oder β -Faltblätter aus, um Interaktionen des polaren Rückgrades der Polypeptidkette mit den umgebenden Lipiden zu minimieren. Dabei ist der grundsätzliche Aufbau von Membranproteinen speziell im Bereich der Transmembrandomänen stark konserviert. So wurde u.a. in den Arbeiten von Killian *et al.* (2003) der

typische Aufbau einer membrandurchspannenden Helix eines integralen Membranproteins aufgezeigt. Transmembrandomänen besitzen demnach meist eine zentrale hydrophobe Region, die reich an aliphatischen Aminosäuren ist. Die Seitengruppen dieser Aminosäuren sind zu den umgebenden Acyl-Seitenketten der Phospholipide exponiert und interagieren mit den unpolaren CH-Gruppen. Allerdings bilden die Acyl-Seitenketten der Lipide nur 50% der Gesamtdicke einer Biomembran aus. Die anderen 50% werden durch die Kopfgruppen an beiden Seiten der Membran gebildet. Dementsprechend weisen integrale Membranproteine an beiden Seiten ihrer Transmembranhelices Cluster von aromatischen und geladenen AS-Seitenketten auf. Abbildung 1.9 zeigt, dass der hydrophobe Kern der Transmembranhelices zu beiden Seiten zunächst durch einen Gürtel von aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin abgegrenzt ist. Die chemischen Eigenschaften dieser Aminosäuren favorisieren eine Positionierung an der polaren-apolaren Grenzfläche zwischen den Acyl-Seitenketten und den Kopfgruppen innerhalb der Lipidmembran. Geladene Aminosäuren, wie Lysin oder Arginin, stellen häufig die flankierenden Elemente einer Transmembranhelix dar und interagieren mit den Kopfgruppen der Phospholipide, wie z.B. den negativ geladenen Phosphatgruppen.

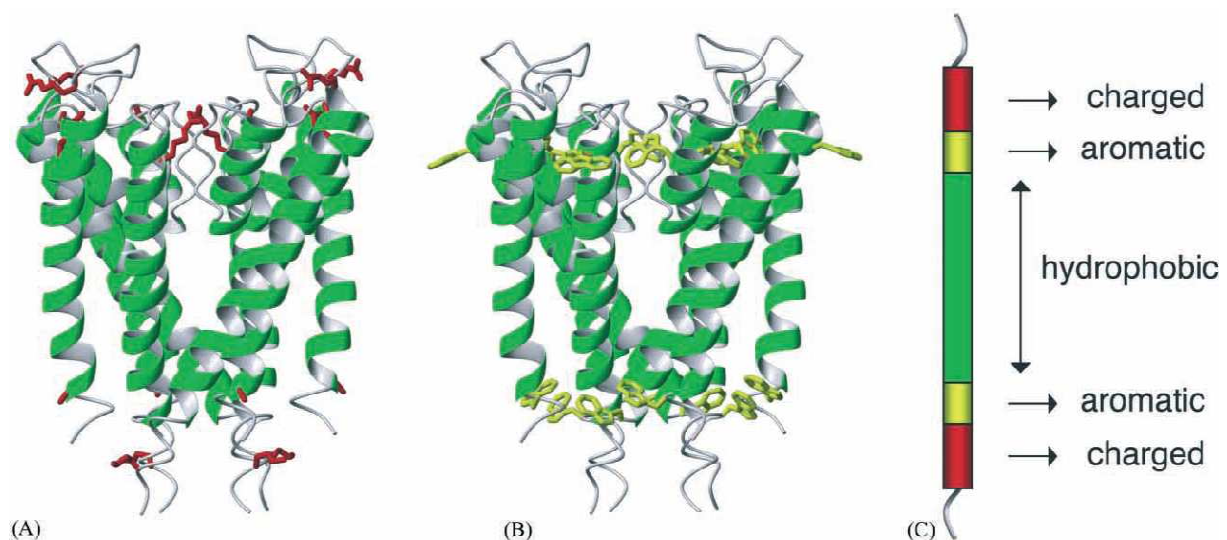


Abb.1.9: Eigenschaften der Transmembranhelices des KcsA-Kanals

Dargestellt ist die Seitenansicht des KcsA-Kanals. Farblich markiert sind die Schlüsselaminosäuren des äußeren Gürtels mit Arginin-Resten in Rot (A) und des inneren Gürtels mit Tryptophan-Resten in Gelb (B). (C) zeigt die schematische Gliederung einer Transmembranhelix (de Planque und Killian, 2003).

Auch die Dicke einer Membran hat einen großen Einfluss sowohl auf die Aktivität der Membranproteine, als auch auf die Proteinsortierung (Mauritsen and Bloom, 1993; Killian *et al.*, 2000; Dumas *et al.*, 1999). Die Membrandicke kommt durch die in ihr enthaltenen Lipide, durch die Anzahl der integralen und peripheren Membranproteine und anderer hydrophober Moleküle, wie z.B. dem Cholesterin zustande. Speziesspezifisch kommt es daher zu unterschiedlichen Dicken der Membranen. Daher kann das gleiche Protein innerhalb verschiedener heterologer Expressionssysteme auch unterschiedlich große hydrophobe *Mismatches* ausbilden. Bei einem hydrophoben *Mismatch* entspricht die Länge einer Transmembrandomäne nicht dem Durchmesser

der umgebenden Membran. Da dies energetisch ungünstig ist, gibt es eine Reihe von Mechanismen, die einen hydrophoben *Mismatch* verhindern oder abschwächen (Abb.1.10). Typischerweise bestehen Transmembranhelices aus ungefähr 20, in der Regel hydrophoben, Aminosäuren, die entweder gerade oder leicht angewinkelt die Membran durchspannen. Je nach Dicke der Membran kann es zu einem positiven hydrophoben *Mismatch*, wobei die transmembrane Helix länger als die umgebende Lipiddoppelschicht ist, oder zu einem negativen *Mismatch*, wo sie kürzer ist, kommen. Daher führt die Art des hydrophoben *Mismatches* und dessen Größe sowie die Art und Weise, wie Protein und Membran es kompensieren, zu einer veränderten Struktur des Membran-Protein-Komplexes und somit zu einer unterschiedlichen Aktivität innerhalb der verschiedenen Expressionssysteme (Killian und von Heijne, 2000).

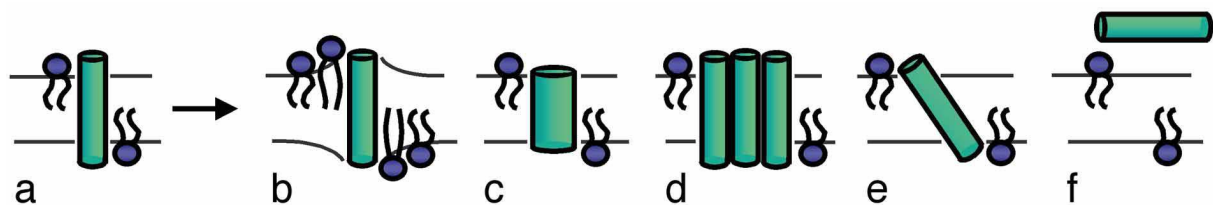


Abb.1.10: Schematische Darstellung von Mechanismen zur Reduzierung eines hydrophoben *Mismatches*

Dargestellt sind mögliche Mechanismen, durch welche ein vorhandenes positives hydrophobes *Mismatch* durch Adaptionen des Transmembransegments oder der Lipiddoppelschicht ausgeglichen werden können. Bestehendes hydrophobes *Mismatch* (a), Umordnung der Fettsäureketten (b), Deformierung des Peptid-Rückgrats (c), Oligomerisierung der Transmembranhelices (d), Peptid-Neigung (e), kein Einbau in die Membran (f) (de Planque und Killian, 2003).

Wie oben bereits ausführlich beschrieben kommt es bei der Expression von Kcv in verschiedenen heterologen Expressionssystemen zu unterschiedlichen Kinetiken der Stromantworten. Inwieweit dieses Phänomen auf das Verhältnis der Länge der Transmembranhelix zur Dicke der jeweiligen Membran zurückzuführen ist, wurde in vorangegangenen Studien in ersten Ansätzen untersucht (Hertel 2005; Baumeister 2006). Die Grundidee dieser Studien basierte darin, dass die TM1 von Kcv durch gezielte Mutationen verlängert oder verkürzt wurde (Abb.1.11). Dabei führte eine Verkürzung der TM1 zu einem völligen Verlust der Leitfähigkeit. Zu überraschenden Ergebnissen kam man allerdings bei einer Verlängerung der TM1. Während eine Alanin-Insertion an Position 32, also am C-terminalen Ende der TM1, zu einer nicht funktionellen Kcv-Mutante führt, erhält man, im Gegensatz dazu, bei einer Alanin-Insertion im N-terminalen Bereich eine Kcv-Mutante, die eine ausgeprägte Leitfähigkeit aufweist. Allerdings unterscheidet sich die Kinetik dieser Mutante deutlich von der typischen Kcv-wt-Kinetik. So kommt es zu einem biphasischen Stromverlauf, zu keiner Inaktivierung bei Spannungen unter -80 mV und zu einer signifikant höheren Stromamplitude. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Länge und die Positionierung der TM1 innerhalb der Lipid-Membran einen entscheidenden Einfluss auf die Kinetik des Kanals haben muss. Diese Ergebnisse stellen die Grundlage für diesen Teil der Arbeit dar.

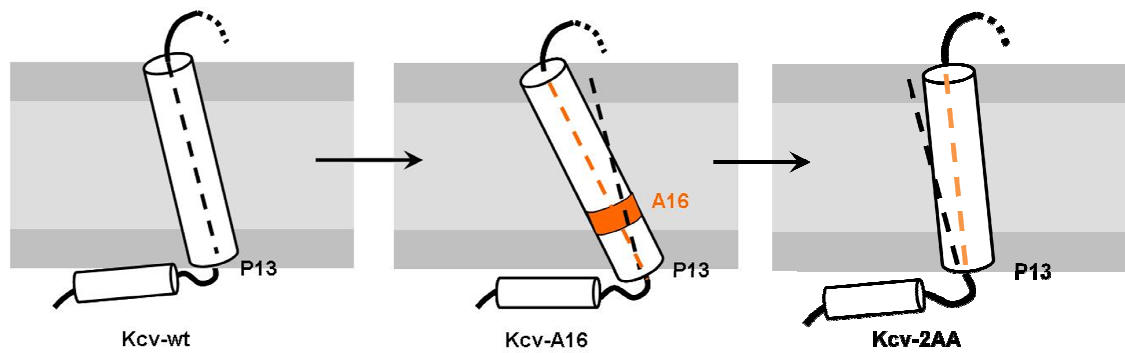


Abb.1.11: Mögliche Auswirkung einer Verkürzung oder Verlängerung der TM1 auf die Positionierung innerhalb der Membran

In dieser Darstellung ist die mögliche Neigung der TM1 von Kcv-wt als dunkel gestrichelte Linie gezeigt. Die hell gestrichelte Linie stellt die veränderte Neigung bei einer Verlängerung bzw. bei einer Verkürzung der TM1 dar.

1.5. Zielsetzung – Teil1

Die Struktur-Funktions-Zusammenhänge von Kaliumkanälen sind sehr komplex. Im ersten Teil dieser Arbeit soll das Verständnis dieser Zusammenhänge anhand des viralen Kaliumkanals Kcv erweitert werden. Dabei konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Rolle der ersten Transmembrandomäne für die Kanalfunktion. Im Fokus stehen die Toleranz gegenüber einer veränderten Länge und deren Einfluss auf das *Gating*, sowie die Orientierung der TM1 innerhalb der Membran und die Interaktion mit den umgebenden Lipiden.

In vorangegangenen Studien wurde beobachtet, dass eine Alanin-Insertion an der cytoplasmatischen Seite der TM1 zu einem funktionellen Kanal führt, dessen Kinetik sich jedoch stark vom Wildtyp unterscheidet (Hertel *et al.*, 2006). Insetiert man das Alanin jedoch an der extrazellulären Seite, weist diese Mutante keinerlei Funktion auf (Baumeister 2006). Dementsprechend scheinen manche Bereiche der TM1 auf eine Alanin-Insertion weniger sensibel zu reagieren als andere Bereiche.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Bereiche der Membran die Alanin-Insertion tolerieren und ob sich deren Kinetik aufgrund der Alanin-Insertion verändert. Dazu wurden Kcv-Mutanten hergestellt, die über die gesamte Länge der TM1 an den Positionen 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 19, 18, 17, 16, 15 und 14 jeweils um ein Alanin verlängert sind. Diese Mutanten wurden in HEK293-Zellen exprimiert und mittels der *Patch-Clamp*-Technik in der *whole-cell*-Konfiguration elektrophysiologisch charakterisiert. In ergänzenden Experimenten wurde ein Hefekomplementationstest zur Funktionsanalyse durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine positionsabhängige Verlängerung der TM1 im Kontaktbereich mit der TM2 eine zusätzliche langsame Aktivierung von Kcv-Kanälen mit sich bringt. Die Daten werden vor dem Hintergrund diskutiert, dass eine veränderte Salzbrückendynamik in diesem Bereich einen trägen und spannungsabhängigen *Gating*-Prozess beeinflusst.

2. Ergebnisse - Teil 1

2.1. Heterologe Expression von Kcv in HEK293-Zellen

Die Expression rekombinanter Proteine in heterologen Expressionssystemen hat neue Möglichkeiten der Erforschung von Ionenkanälen und der Aufklärung ihrer Funktion eröffnet. Als Expressionssysteme werden dabei beispielsweise die Oozyten von *Xenopus laevis* oder immortalisierte Zelllinien wie CHO- oder HEK293-Zellen verwendet. Die Expression von Ionenkanälen führt in diesen Zellen jeweils zu charakteristischen Veränderungen der Membranleitfähigkeit. In dieser Arbeit wurden zur funktionellen Charakterisierung ausschließlich HEK293-Zellen (**H**uman **E**mbryonic **K**idney **C**ells) verwendet. HEK293-Zellen sind für elektrophysiologische Untersuchungen von Kaliumkanälen sehr gut geeignet, da sie eine geringe endogene Kaliumleitfähigkeit aufweisen und die elektrophysiologischen Eigenschaften ihrer Membran und der darin enthaltenen endogenen Kanalproteine bereits ausführlich charakterisiert wurden (Yu und Kerchner 1998, Jiang *et al.*, 2002).

2.1.1. Expression von Kcv in HEK293-Zellen

Exprimiert man den viralen Kaliumkanal Kcv in einer HEK293-Zelle, vermittelt dieser eine charakteristische einwärtsgleichrichtende Leitfähigkeit. Eine typische Strom-Spannungskurve verläuft im Bereich von -60 mV bis +20 mV weitgehend linear, wobei instantaner Strom (I_i) und stationärer Strom (I_{ss}) ungefähr die gleiche Größe aufweisen. Bei negativeren Spannungen kommt es zunehmend zu einer Inaktivierung, das heißt, der stationäre Strom ist kleiner als der instantane Strom. Desweiteren ist in der Strom-Spannungskurve eine deutliche negative Kennlinie zu erkennen, was bedeutet, dass trotz zunehmender negativer Spannung keine weitere Erhöhung des Stroms eintritt. Stattdessen kommt es ab einer angelegten negativen Spannung von ca. -100 mV erst zu einer Sättigung und dann sogar zu einer geringen Abnahme des Stroms.

Abbildung 2.1b zeigt eine typische Stromantwort einer HEK293-Zelle, die den Kcv-wt-Kanal exprimiert, bei einer *Patch-Clamp*-Messung in der *whole-cell*-Konfiguration. Zum Vergleich ist in Abbildung 2.1c die Stromantwort einer EGFP-transfizierten Kontrollzelle dargestellt. Dabei wird deutlich, dass durch die Expression von Kcv eine charakteristische spannungsabhängige Leitfähigkeit vermittelt wird, die sich bei den Beispielmessungen in der Stromamplitude wie auch in der I/V Beziehung deutlich von der Kontrolle unterscheidet.

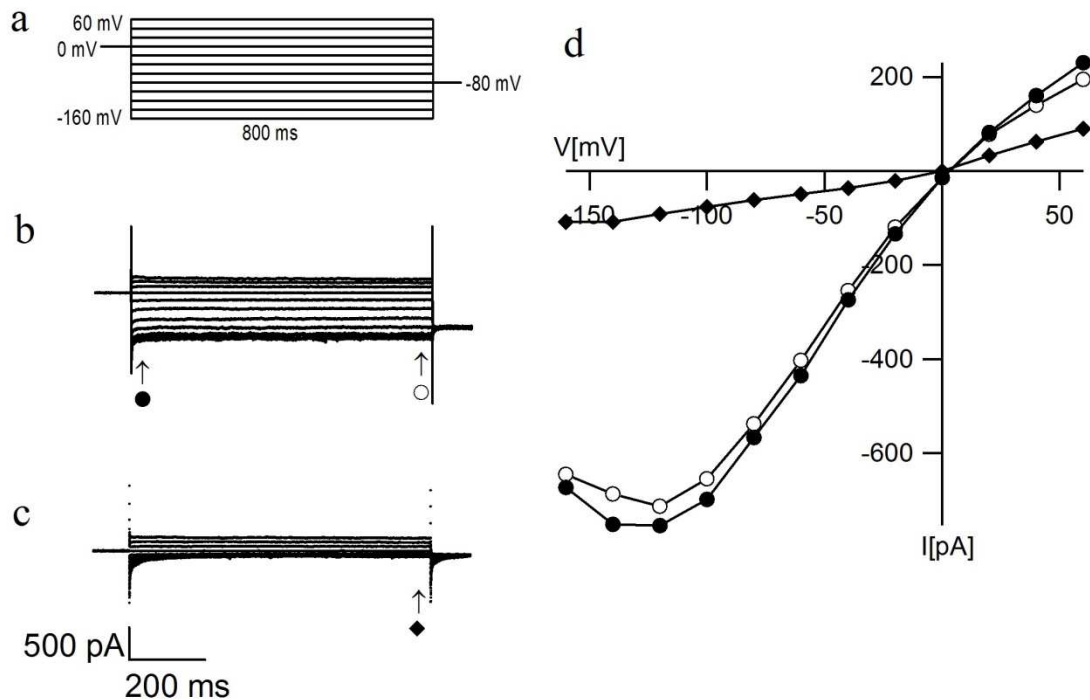


Abb.2.1: Expression von Kcv in HEK293-Zellen

Stromantworten einer Kcv-transfizierten HEK293-Zelle (b) und einer EGFP-transfizierten Kontrollzelle (c) in einer Standardbadlösung. In den Strom-Spannungskurven (d) sind instantaner Strom (I_i , ●) und stationärer Strom (I_{ss} , ○) von einer Kcv-transfizierten HEK293-Zelle im Vergleich zu einer EGFP-transfizierten (◆) Kontrollzelle dargestellt. Dabei entspricht der instantane Strom (I_i , ●) bei dieser Art der Darstellung dem Mittelwert aller Messpunkte im Bereich von 0,8-1,6 ms nach dem Spannungssprung und der stationäre Strom dem Mittelwert aller Messpunkte im Bereich von 760-784 ms. Das Standardpulsprotokoll (a) umfasst einen Spannungsbereich von +60 mV bis -160 mV. In einigen der folgenden Abbildungen wird die Stromantwort auf den Spannungspuls von -160 mV zum Teil jedoch nicht aufgeführt.

Der durchschnittliche Strom, der bei Kcv-wt exprimierenden HEK293-Zellen bei -140 mV gemessen wurde liegt bei $-679 \text{ pA} \pm 342 \text{ pA}$ ($n=13$) (Abb.2.2). Dagegen lagen die Stromantworten auf die angelegte Referenzspannung von -140 mV bei den pEGFP-transfizierten Kontrollzellen durchschnittlich bei nur $-108 \pm 28 \text{ pA}$ ($n=17$).

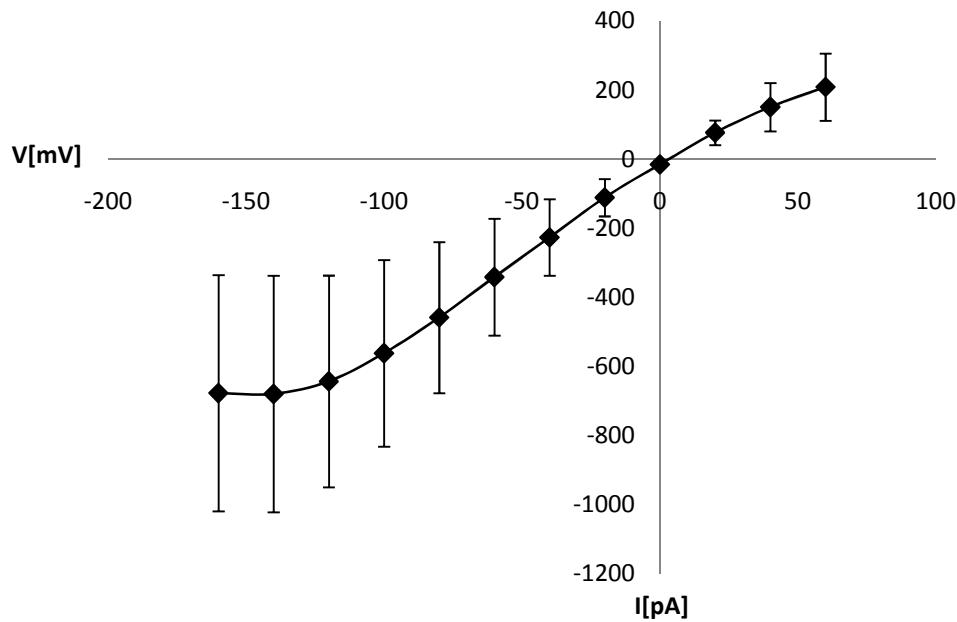


Abb.2.2: Strom-Spannungskurve von Kcv-wt-Messungen

Strom-Spannungsbeziehung der stationären Ströme von Kcv-transfizierten HEK293-Zellen in einer Badlösung mit 100 mM KCl. Dargestellt sind die Mittelwerte von 13 Messungen mit den Standardabweichungen.

Wie in Abbildung 2.2 deutlich wird, ist die Standardabweichung der Stromantworten der 13 ausgewerteten Messungen von Kcv-wt vor allem im Bereich der negativeren Spannungen relativ groß. Diese großen Abweichungen in der Stromantwort können einerseits darauf zurückgeführt werden, dass in den jeweiligen Zellen zum Zeitpunkt der Messung Unterschiede in der Oberflächen-Expression von Kcv vorlagen. Andererseits können auch Unterschiede in der Größe und Wachstumsphase der jeweiligen Zelle Ursache für die variierende Stromamplitude sein. Trotz dieser Unterschiede ist eine Kcv-exprimierende HEK293-Zelle stets aufgrund der charakteristischen Kinetik eindeutig zu erkennen und von einer nicht transfizierten Zelle sehr gut zu unterscheiden.

2.1.2. Inhibition durch Cholinchlorid

Inhibitoren von Ionenkanälen reduzieren nicht nur die Leitfähigkeit, sondern haben in manchen Fällen auch einen Einfluss auf die Stabilität der Kanal-Tetramere. In einer Untersuchung von Krishnan et al. (2005) wurde die Stabilisierung von Kaliumkanal-Tetrameren durch Kaliumionen am Beispiel von KcsA untersucht. KcsA hat, wie alle Kaliumkanäle, spezifische Bindestellen für Kaliumionen innerhalb der Porendomäne. Dabei wird jedes Kaliumion durch acht Sauerstoffatome umgebender Aminosäuren innerhalb des Proteins koordiniert (s. Einleitung – Permeation). Diese Kation-Sauerstoff-Interaktion hat neben der Selektivität auch einen Einfluss auf die strukturelle Stabilität des Tetramers. Dabei ist zu beachten, dass unterschiedliche anorganische Kationen zu verschiedenen

Stabilitäten des Tetramers führen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Ionen, die KcsA gut passieren oder stark blocken, zu einer erhöhten Stabilität führen, wogegen leichte Blocker wie Cholin oder Ionen, die den Kanal nicht passieren können wie z.B. Na^+ , das Tetramer destabilisieren (Krishnan *et al.*, 2005). Vergleichbare Studien am viralen Kcv-Kanal konnten aufzeigen, dass auch dieser ähnliche Kationen bedingte Eigenschaften aufweist (Pagliuca *et al.*, 2007; Chatelain *et al.*, 2009).

Dass Cholinchlorid zu einer Reduktion der Leitfähigkeit von Kcv führt, wurde erstmals im Rahmen der Doktorarbeit von Brigitte Hertel nachgewiesen. Bei *Voltage-Clamp*-Messungen des Kaliumkanals Kcv in *Xenopus*-Oocyten führte Cholinchlorid zu einer Reduktion des Stroms um ca. 30 % bei -140 mV.

Die Untersuchungen, die zeigen, dass Cholin auch zu einer Destabilisierung der Tetramerstruktur von Kaliumkanälen und zu einer Reduktion der Leitfähigkeit von Kcv in *Xenopus*-Oocyten führt, werfen eine neue Frage auf: Welchen Einfluss hat das Cholinchlorid auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von Kcv und seinen Mutanten in HEK293-Zellen? In allen vorangegangenen Messungen wurde in den Badlösungen der *Patch-Clamp*-Messungen in HEK293-Zellen standardmäßig Cholinchlorid zum Ausgleich der Osmolarität verwendet. Daher soll zu Beginn dieser Arbeit zunächst aufgeklärt werden ob und, wenn ja, in welchem Maße Cholinchlorid die Leitfähigkeit von Kcv im heterologen Expressionssystem HEK293 beeinträchtigt.

Dies soll anhand von Messungen überprüft werden, bei denen eine Kcv-wt-exprimierende HEK293-Zelle zunächst in einer cholinchloridhaltigen Badlösung gemessen wird und nach einem Lösungswechsel die Auswirkungen einer cholinchloridfreien Badlösung überprüft werden.

In Abbildung 2.3b ist eine typische Stromantwort einer HEK293-Zelle, die den Kaliumkanal Kcv exprimiert, in einer Badlösung ohne Cholinchlorid zu sehen. Anstelle des Cholinchlorids wurde Mannitol zum Ausgleich der Osmolarität auf ca. 330 mosmol verwendet. Zum Vergleich ist in Abbildung 2.3c die Stromantwort der gleichen Kcv-wt-transfizierten Zelle in einer Badlösung mit Cholinchlorid dargestellt. Das entsprechende Standardpulsprotokoll ist in Abbildung 2.3a zu sehen. In den Strom-Spannungskurven kann man erkennen, dass die für Kcv charakteristische negative Kennlinie in beiden Lösungen deutlich sichtbar und gleichstark ausgeprägt ist (Abb. 2.3d). Allerdings weichen die Stromamplituden beider Messungen jedoch stark voneinander ab. Tauscht man die Cholinchlorid-haltige Badlösung gegen eine Badlösung ohne Cholinchlorid aus, kommt es zu einer deutlichen Vergrößerung des Stroms.

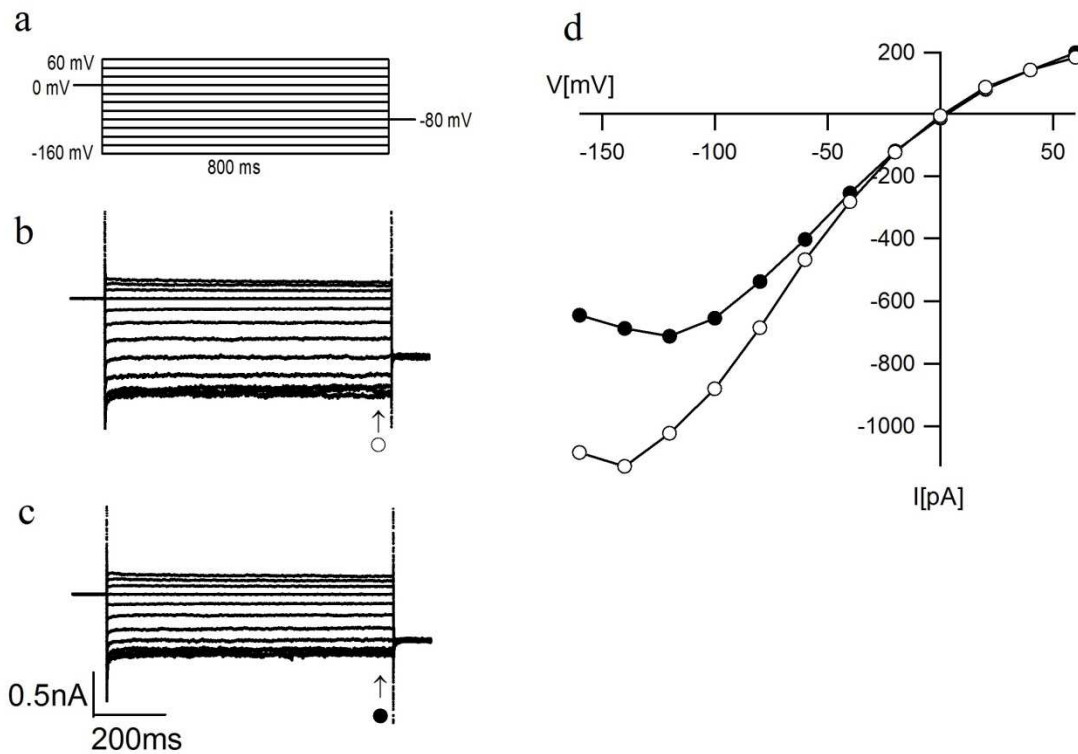


Abb.2.3: Vergleich von Kcv-wt in Badlösungen mit und ohne Cholinchlorid

Stromantworten einer Kcv-transfizierten HEK293-Zelle in einer Badlösung ohne Cholinchlorid (b) und derselben Zelle in einer Badlösung mit Cholinchlorid (c) auf ein Standardpulsprotokoll (a). In den Strom-Spannungskurven (d) sind der *steady-state* Strom mit Cholinchlorid (●) und der *steady-state* Strom ohne Cholinchlorid (○) einer Kcv-transfizierten HEK293-Zelle im Vergleich dargestellt.

Auch bei Betrachtung der Mittelwerte aller Messungen wird dieser große Unterschied der Stromamplituden deutlich. So liegt der durchschnittliche Strom in einer Badlösung **ohne** Cholinchlorid von Kcv exprimierenden HEK293-Zellen bei -140 mV bei $-1773\text{ pA} \pm 1020\text{ pA}$ ($n=24$) (Abb.2.4). Dagegen lagen die durchschnittlichen Stromantworten auf die angelegte Referenzspannung bei -140 mV in einer Badlösung **mit** Cholinchlorid bei $-679\text{ pA} \pm 341\text{ pA}$ ($n=13$).

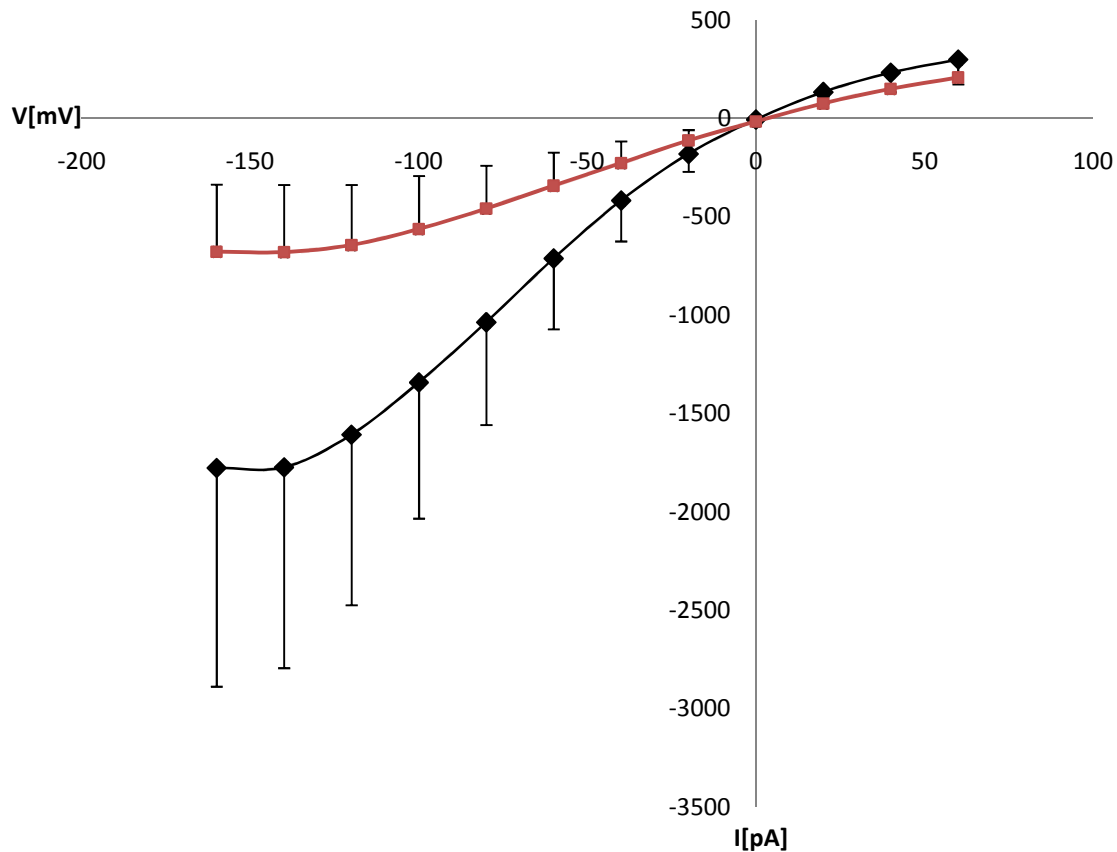


Abb.2.4: Vergleich der Strom-Spannungs-Kurve von Kcv-wt-Messungen in einer 100 mM KCl-Badlösung mit und ohne Cholinchlorid

Strom-Spannungsbeziehung der stationären Ströme von Kcv-transfizierten HEK293-Zellen in einer Badlösung mit 100 mM KCl. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen ohne Cholinchlorid (schwarz) und mit Cholinchlorid (rot) in der Badlösung mit den entsprechenden Standardabweichungen.

In Abbildung 2.5 ist die prozentuale Veränderung des Stroms bedingt durch den Einfluss von Cholinchlorid bei unterschiedlichen Spannungen dargestellt. Wie man deutlich erkennen kann, ist die prozentuale Inhibition des Stroms durch Cholinchlorid spannungsabhängig. Das heißt, dass mit steigender negativer Spannung die inhibierende Wirkung von Cholinchlorid größer wird. Wechselt man von einer cholinchloridhaltigen zu einer cholinchloridfreien Badlösung, so liegt bei einer Spannung von beispielsweise -20 mV der prozentuale Anstieg des Stroms durchschnittlich bei 10%, wogegen er bei -160 mV schon bei über 50% liegt.

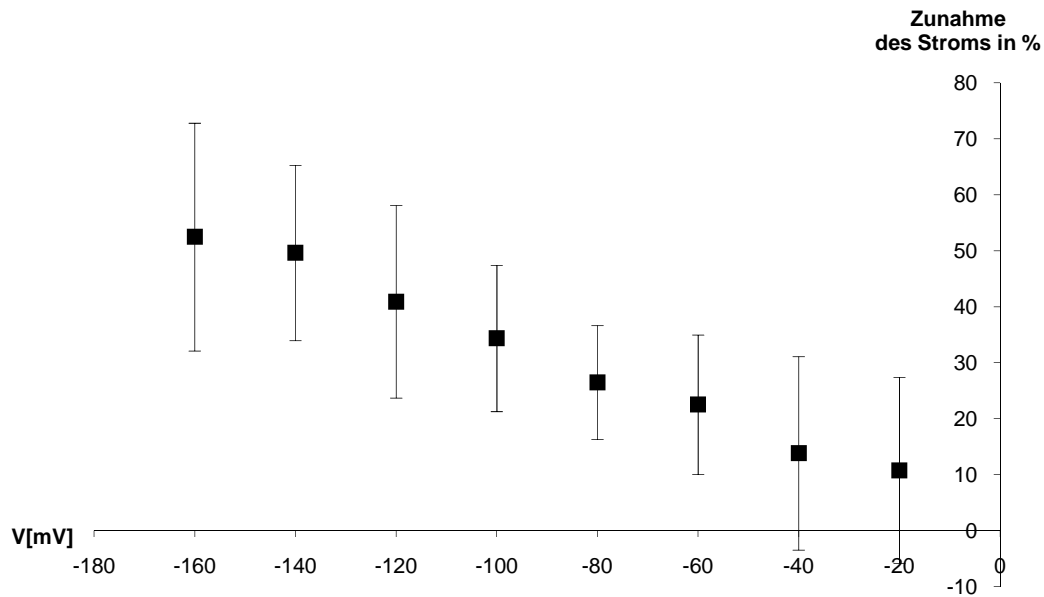


Abb.2.5: Prozentuale Änderung des Stroms durch Cholinchlorid

Durchschnittlicher prozentualer Anstieg des Stroms bei einem Wechsel von einer Cholinchlorid-haltigen Badlösung zu einer Cholinchlorid-freien Badlösung (n=8).

Mit einem Anstieg der Leitfähigkeit von über 50% beim Austausch von Cholinchlorid durch Mannitol in der Badlösung wird deutlich, auf welche unerwartet starke Weise Cholinchlorid die Funktion von Kcv beeinflusst. Dies untermauert die Ergebnisse der vorangegangenen Studien, die zeigen konnten, dass Cholinchlorid einen inhibierenden Effekt auf die Leitfähigkeit von Kcv in *Xenopus* Oocyten hat. Demnach scheint Cholinchlorid einen inhibitorischen Einfluss auf Kaliumkanäle im Allgemeinen zu haben, da nicht nur der bakterielle KcsA-Kanal durch Cholin blockiert wird (Krishnan *et al.*, 2005), sondern auch beim viralen Kaliumkanal Kcv eine deutliche Reduktion der Leitfähigkeit auftritt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle folgenden Messungen eine Badlösung verwendet, in der die Osmolarität durch Mannitol ausgeglichen wird.

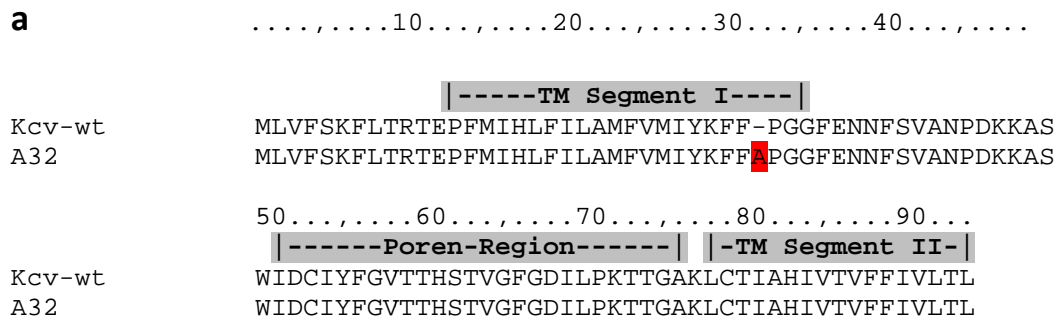
2.2. Verlängerung der TM1

Wie oben bereits beschrieben, konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass manche Bereiche der TM1 auf eine Alanin-Insertion weniger sensibel reagieren als andere Bereiche. Während eine Alanin-Insertion an der cytoplasmatischen Seite der TM1 zu einem funktionellen Kanal führt, dessen Kinetik sich jedoch stark vom Wildtyp unterscheidet, kommt es bei einer Insertion an der C-terminalen Seite zu einem kompletten Funktionsverlust der Mutante (Hertel *et al.*, 2006; Baumeister 2006).

In diesem Teil der Arbeit soll untersucht werden welche Bereiche der Membran die Alanin-Insertion tolerieren und wie sich deren Kinetik aufgrund der Alanin-Insertion verändert. Es werden ausschließlich Alanine eingefügt, da diese Aminosäure einen kleinen, ungeladenen und apolaren Methylrest als Seitengruppe hat. Zudem ist Alanin die Aminosäure mit der höchsten Präferenz zur Ausbildung einer Helix (O'Neil und DeGrado, 1990). Daher sollte in diesem Fall die TM1 weiterhin eine Helix ausbilden, die jedoch um eine Aminosäure verlängert ist und somit zu einer veränderten Anordnung innerhalb der Lipiddoppelschicht führt. Eine solche strukturelle Veränderung könnte zu einem *hydrophoben Mismatch*, einer veränderten Neigung innerhalb der Membran oder zu einer Drehung um die eigene Achse und somit zu veränderten Interaktionen mit Lipiden und benachbarten Proteinabschnitten führen.

2.2.1. Insertion eines Alanins an Position 32 (Kcv-A32)

Die erste Verlängerung der TM1 erfolgte an der extrazellulären Seite der ersten Transmembrandomäne. In Abbildung 2.6 ist die Aminosäuresequenz der Kcv-A32-Mutante im Vergleich zum Kcv-Wildtyp dargestellt.



b

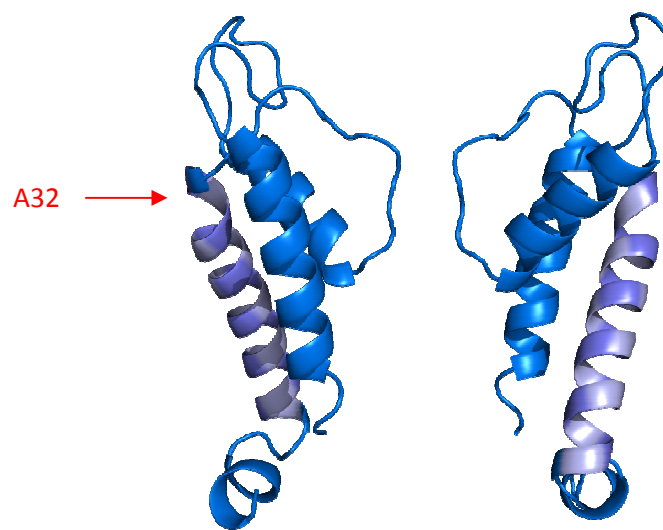


Abb.2.6: Insertion eines Alanins an Position 32 (Kcv-A32)

Dargestellt ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen von Kcv-wt mit der Sequenz der Kcv-A32-Mutante (a). Rot markiert ist die Position der Alanin-Insertion. Die grauen Balken zeigen die Position der Transmembrandomänen und der Porenregion an.

Die Modelldarstellung (b) zeigt die Position der Insertion. Dabei ist die Grundlage für das Modell die mittlere Struktur aus molekulardynamischen Simulationen über 30 ns ausgehend von einem Homologiemodell für Kcv auf der Basis der bekannten Kristallstruktur von KirBac1.1 (Tayefeh *et al.*, 2009).

In Abbildung 2.7 sind die typischen Stromantworten auf ein Standard-Pulsprotokoll einer Kcv-A32-transfizierten HEK293-Zelle im Vergleich zu einer mit Kcv-wt-transfizierten Zelle und einer mit EGFP-transfizierten Kontrollzelle dargestellt. Bei dieser Mutante stellte sich heraus, dass die Insertion eines Alanins an Position 32 zu einem völligen Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit führt. Dabei ist die Leitfähigkeit der Kcv-A32-Mutante (Abb. 2.7b) mit der Leitfähigkeit der Kontrollzelle vergleichbar (Abb. 2.7d).

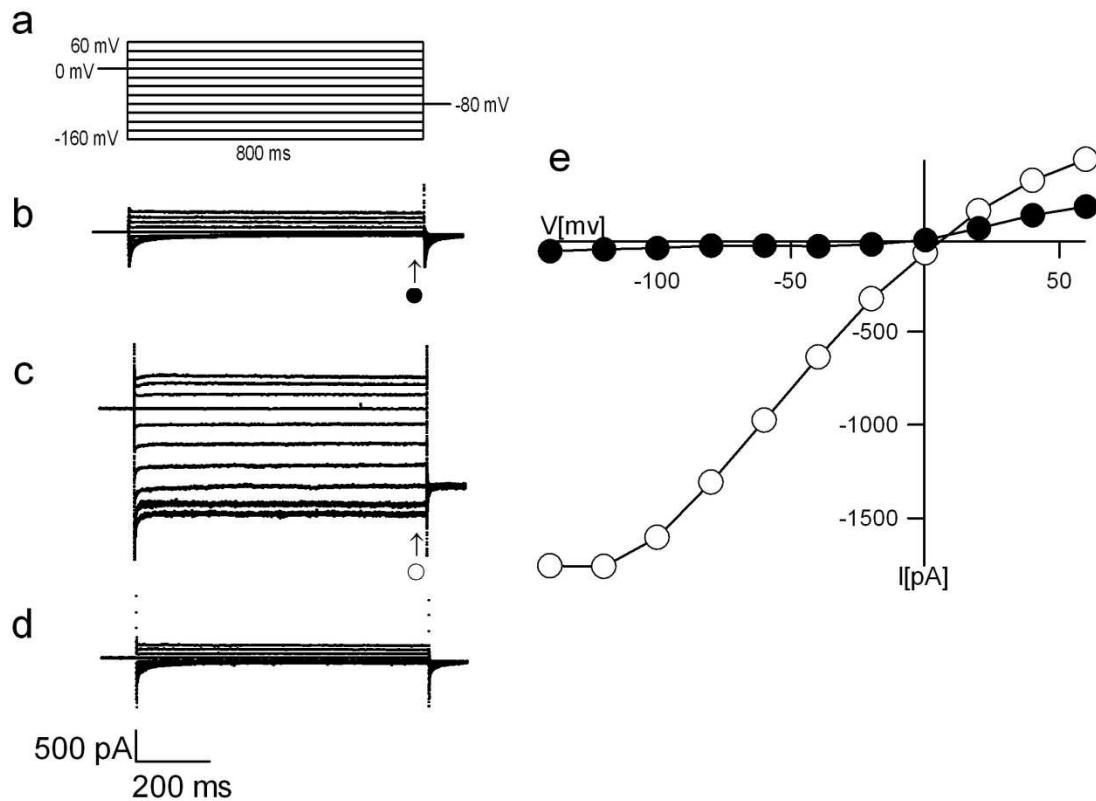


Abb.2.7: Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit in der Kcv-A32-Mutante

Stromantworten einer Kcv-A32- (b), Kcv-wt- (c) und EGFP- (d) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (a) in einer 100 mM KCl-Badlösung. In den Strom-Spannungskurven (e) sind die stationären Ströme aus (b,●) und (c,○) dargestellt.

Es wurden insgesamt 14 Messungen der Kcv-A32-Mutante erzielt, wobei der durchschnittliche Strom bei einer angelegten Spannung von -140 mV bei $-100\text{ pA} \pm 61\text{ pA}$ liegt (Abb.2.8). Dieser geringe Wert entspricht der Stromgröße, die auch durchschnittlich in EGFP-transfizierten HEK293-Zellen bei gleicher Spannung vorliegt. Beim Wildtyp liegt er mit $-1773\text{ pA} \pm 1020\text{ pA}$ ($n=24$) (siehe auch Abb.2.4) deutlich höher.

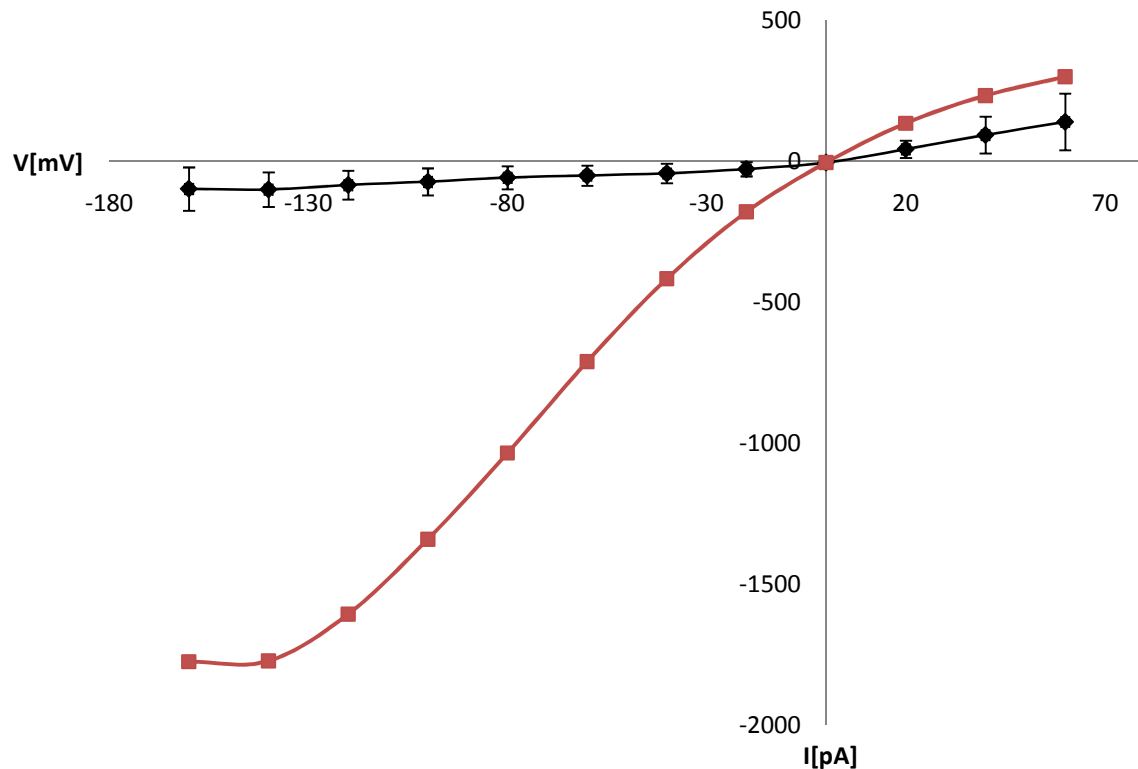


Abb.2.8: Strom-Spannungskurve der Kcv-A32-Mutante mit 100 mM KCl

Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme von Kcv-A32-transfizierten HEK293-Zellen in einer 100 mM KCl-Badlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 14 Messungen mit den Standardabweichungen (schwarze Kurve). Ohne Standardabweichung sind die Mittelwerte von Kcv-wt-transfizierten HEK293-Zellen (rote Kurve) zum Vergleich dargestellt.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Insertion eines Alanins an Position 32 zu einem völligen Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit führt.

2.2.2. Insertionen eines Alanins an den Positionen 30-14 der TM1

Um die Positionsabhängigkeit dieser Verlängerung innerhalb der TM1 zu überprüfen wurden im weiteren Verlauf dieser Studie Kcv-Varianten untersucht, deren TM1 an verschiedenen Positionen verlängert wurde. Die Alanin-Insertionen erfolgten im Bereich von Position 30-20 nach jeder zweiten Aminosäure und im Bereich von Position 20-14 wurde an jeder Position ein Alanin inseriert. An Position 13 befindet sich ein Prolin in der Sequenz von Kcv. Diese knickbildende Aminosäure stellt das Ende der TM1 dar und separiert die TM1 von der N-terminalen *slide*-Helix. Die Auswirkungen von Mutationen dieser AS wurden schon in vorangegangenen Studien ausführlich untersucht (Hertel *et al.*, 2006). Im Folgenden werden die Ergebnisse der Insertionen A30-A14 zunächst zusammengefasst dargestellt.

In Abbildung 2.9 sind die Positionen der einzelnen Verlängerungen im Vergleich zur Kcv-wt-Sequenz aufgelistet.

a

10.....20.....30.....40.....
	-----TM Segment I-----
Kcv-wt	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYK-FFPGGFENNFSVANPDKKAS
A30	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYK ^A FFPGGFENNFSVANPDKKAS
A28	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMI ^A YKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A26	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFV ^A MIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A24	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAM ^A FVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A22	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFI ^A LAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A20	MLVFSKFLTRTEPFMIHLF ^A LAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A19	MLVFSKFLTRTEPFMIHL ^A LAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A18	MLVFSKFLTRTEPFMIH ^A LFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A17	MLVFSKFLTRTEPFMI ^A HLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A16	MLVFSKFLTRTEPFM ^A IHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A15	MLVFSKFLTRTEPF ^A MIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
A14	MLVFSKFLTRTEP ^A MIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS

b

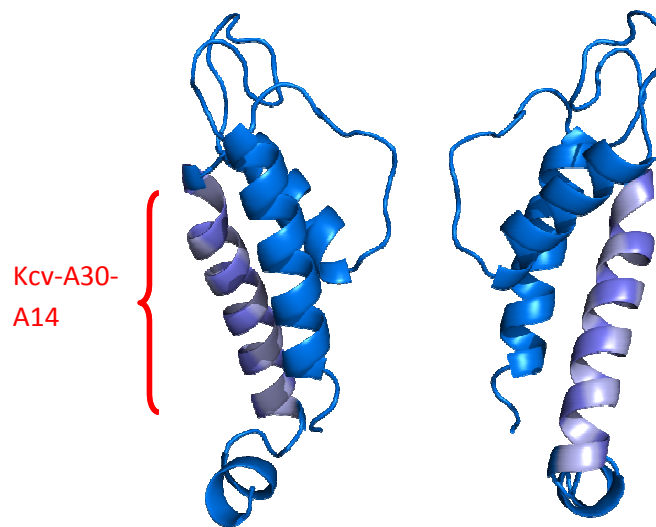


Abb.2.9: Insertion eines Alanins an den Position 30-14 (Kcv-A30-A14)

Dargestellt ist ein Aminosäuren-Alignment der Kcv-wt-Sequenz mit den Sequenzen der Kcv-Alanin-Insertions-Mutanten. Zur besseren Übersicht ist nur die N-terminale Hälfte des Alignments aufgeführt. Rot markiert ist die Position der jeweiligen Alanin-Insertion. Der graue Balken zeigt die Position der ersten Transmembrandomäne an.

Die Modelldarstellung (b) zeigt die Position der Insertionen an. Dabei ist die Grundlage für das Modell die mittlere Struktur aus molekulardynamischen Simulationen über 30 ns ausgehend von einem Homologiemodell für Kcv auf der Basis der bekannten Kristallstruktur von KirBac1.1 (Tayefeh *et al.*, 2009).

In Abbildung 2.10 sind die typischen Stromantworten von HEK293-Zellen, die mit jeweils einer Verlängerungsmutante transfiziert wurden, auf ein Standard-Pulsprotokoll dargestellt. Zum Vergleich sind auch die Stromantworten einer Kcv-wt-transfizierten Zelle und einer mit EGFP-transfizierten Kontrollzelle gezeigt.

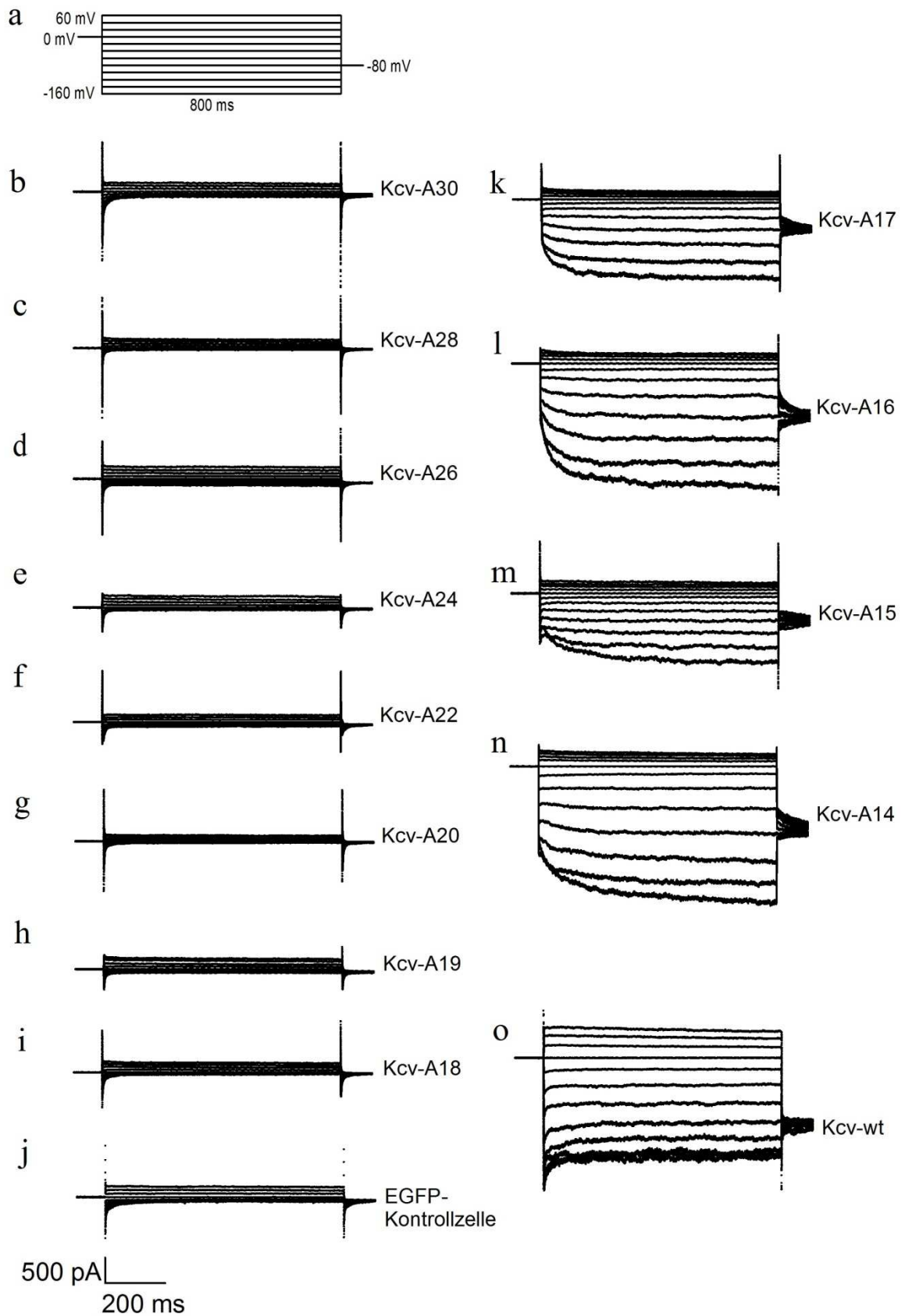


Abb.2.10: Veränderung der Kcv-typischen Leitfähigkeit bei einer Verlängerung im Bereich von A30-A14

Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Stromantwort der Kcv-A30 bis Kcv-A14-Mutanten. Zum Vergleich sind auch die Stromantworten einer Kcv-wt- (o) und EGFP- (j) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (a) in einer 100 mM KCl-Badlösung dargestellt.

Bei den Mutanten im Bereich von A30-A18 stellte sich heraus, dass die Insertion eines Alanins zu einem völligen Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit führt. Daher ist die Stromantwort dieser Kcv-Mutanten auf ein Standardpulsprotokoll (Abb. 2.10 b-i) mit der Stromantwort der Kontrollzelle (Abb. 2.10 j) vergleichbar. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Leitfähigkeit, wie sie durch Kcv-wt (Abb. 2.10 o) vermittelt wird, bei keiner dieser Mutanten auftritt. Es ist nur die minimale endogene Leitfähigkeit der HEK293-Zellen vorhanden. Kleine Unterschiede der Stromantworten sind bei den Auswärtsströmen zu erkennen. Da diese allerdings, wie oben beschrieben, überwiegend durch die Aktivität endogener Kanäle vermittelt wird, ist dies vermutlich auf andere Faktoren, wie Größe oder Wachstumsphase der jeweiligen Zelle zurückzuführen.

Ein völlig anderes und überraschendes Ergebnis zeigen die Verlängerungen im Bereich von A17-A14 (Abb. 2.10 k-n). So zeigen diese Kcv-Mutanten nicht nur eine Leitfähigkeit in der Größenordnung von Kcv-wt (Abb. 2.10 o), sondern zudem kommt es zu einer signifikanten Veränderung der Kinetik der Stromantwort. Die für die Expression in HEK293-Zellen charakteristische schnelle Inaktivierung des Stroms des Kcv-wt-Kanals ist bei den Mutanten nicht mehr vorhanden. Stattdessen kommt es zu einem völlig gegenteiligen Verhalten. So ist der stationäre Strom deutlich größer als der instantane Strom, da es vor allem bei negativen Spannungen ab ca. -100 mV zu einer ausgeprägten, langsamen Aktivierung kommt. Eine ähnliche Veränderung der Kinetik konnte auch schon in vorangegangenen Studien beobachtet werden (Hertel *et al.*, 2006). So führte beispielsweise eine Substitution des Prolins an Position 13, also unmittelbar vor der TM1, durch ein Alanin zu einer vergleichbaren Kinetik der Stromantwort.

Betrachtet man alle Verlängerungsmutanten der TM1 auf einen Blick, ergibt sich dementsprechend ein deutlich zwei-geteiltes Bild. Auf der einen Seite stehen alle nicht funktionellen Mutanten, deren Alanin-Insertion oberhalb der Position 17 liegt, und auf der anderen Seite stehen die funktionellen Insertionsmutanten A17-A14. Neben den veränderten Kinetiken der funktionellen Mutanten ist dabei besonders auffällig, dass der Übergang von funktionell zu nicht funktionell keinen kritischen Übergangsbereich aufweist. Stattdessen kommt es zu einem abrupten Schnitt, der eine strikte Grenze darstellt. Dies wird vor allem bei Betrachtung der durchschnittlichen Stromamplituden bei einer Referenzspannung von -140 mV deutlich (Abb. 2.11).

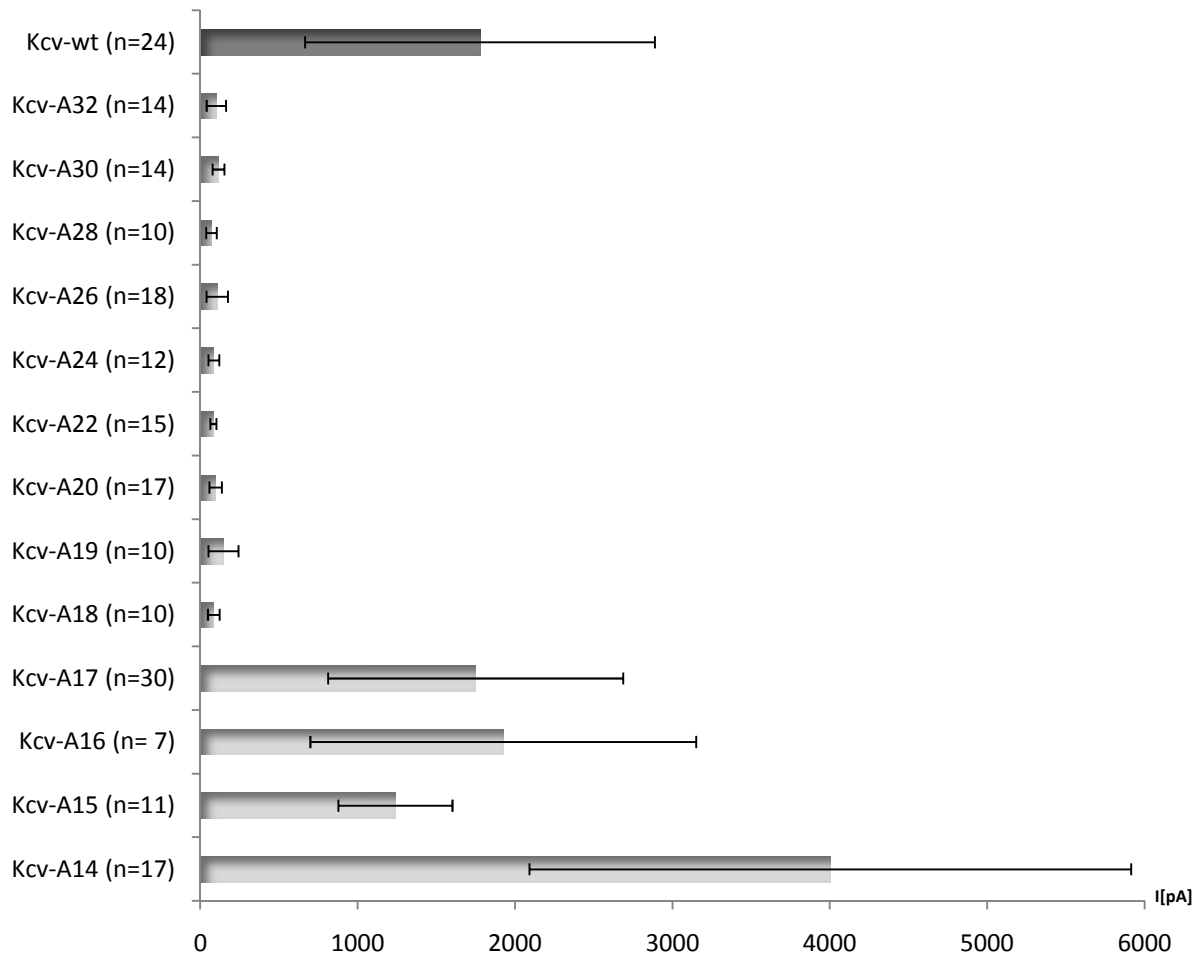


Abb. 2.11: Durchschnittliche Stromamplituden bei -140 mV

Dargestellt sind die Mittelwerte der Stromamplituden der stationären Ströme bei einer Referenzspannung von -140 mV.

In Abbildung 2.11 kann man die Zweiteilung der TM1 sehr gut erkennen. Während die Alanin-Insertion an Position 18 noch zu einem völligen Verlust der Leitfähigkeit führt, wird bei einer Insertion an der direkt benachbarten Position 17 die Verlängerung nicht nur toleriert, sondern die durchschnittliche Stromamplitude ist direkt auf dem Level von Kcv-wt. Diese scharfe Grenze von funktionell zu nicht funktionell wird auch durch den Hefekomplementationstest bestätigt (Abb.2.12). Bei der Hefekomplementation handelt es sich um eine alternative, von elektrophysiologischen Messmethoden unabhängige Technik, die im zweiten Teil dieser Arbeit ausführlicher beschrieben wird (siehe Kapitel 5.1).

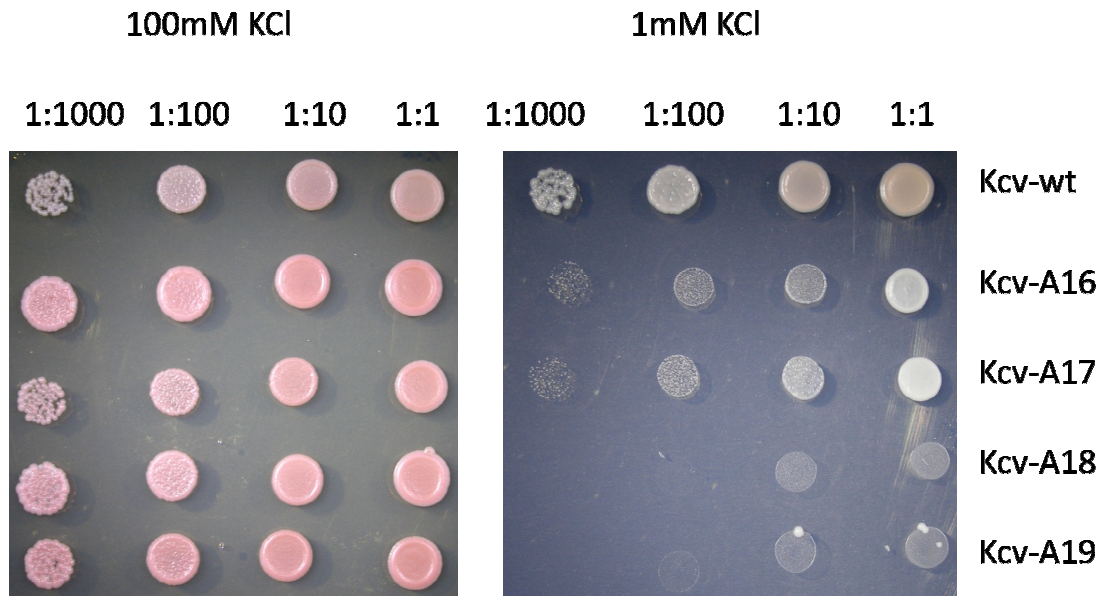


Abb. 2.12: Hefekomplementationstest der Kcv-Verlängerungsmutanten A19-A16

Dargestellt sind Ausschnitte von Agarplatten mit den KCl-Konzentrationen 1 mM und 100 mM. Auf allen Platten sind die Kcv-Verlängerungsmutanten A19-A16 sowie Kcv-wt als Positivkontrolle in den Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 aufgetragen.

In Abbildung 2.12 kann man erkennen, dass alle Hefen unabhängig von der jeweilig transfizierten Kcv-Variante in der Lage sind, bei 100 mM KCl im Außenmedium zu wachsen. Sobald allerdings die Kaliumkonzentration im Außenmedium auf 1 mM herabgesetzt wird, sind neben Kcv-wt als Positivkontrolle nur die Verlängerungsmutanten Kcv-A17 und Kcv-A16 in der Lage, die Kaliumaufnahme und somit das Wachstum der Hefen zu komplementieren. Mit Kcv-A19 oder Kcv-A18 transformierte Hefen sind dagegen nicht in der Lage, unter selektiven Bedingungen zu wachsen. Man kann neben den vereinzelt auftretenden Papillen (siehe auch Kapitel 5) bei den 1:1 und 1:10 verdünnten Proben von Kcv-A19 nur einen schwachen weißlichen Schleier erkennen, bei dem es sich um abgestorbene Hefen handelt. Somit bestätigt sich auch mit dieser ebenfalls sehr sensiblen Methode, dass im Bereich zwischen Position 17 und Position 18 eine Grenze liegt, die festlegt, ob eine Insertion toleriert wird oder ob die Funktionalität komplett verloren geht.

2.2.3. Charakterisierung der Mutanten, die einen träge aktivierenden Einwärtsstrom generieren (Kcv-A17-A14)

Exemplarisch für die Kcv-Mutanten A17-A14, die eine zeitabhängige Leitfähigkeit produzieren (Abb. 2.10), werden im Folgenden die Eigenschaften der Kcv-A17-Mutante ausführlicher aufgezeigt. Dazu ist in Abbildung 2.13 eine typische Stromantwort einer Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zelle im Vergleich zu einer mit Kcv-wt transfizierten Zelle und einer mit EGFP-transfizierten Kontrollzelle auf ein Standard-Pulsprotokoll dargestellt. Charakteristisch für die Kcv-A17 Mutante kommt es bei negativeren Spannungen zu einer zweiphasigen Aktivierung, wo bei negativen Spannungen auf den jeweiligen instantanen Strom eine deutlich träge aktivierende Komponente folgt (Abb. 2.13b).

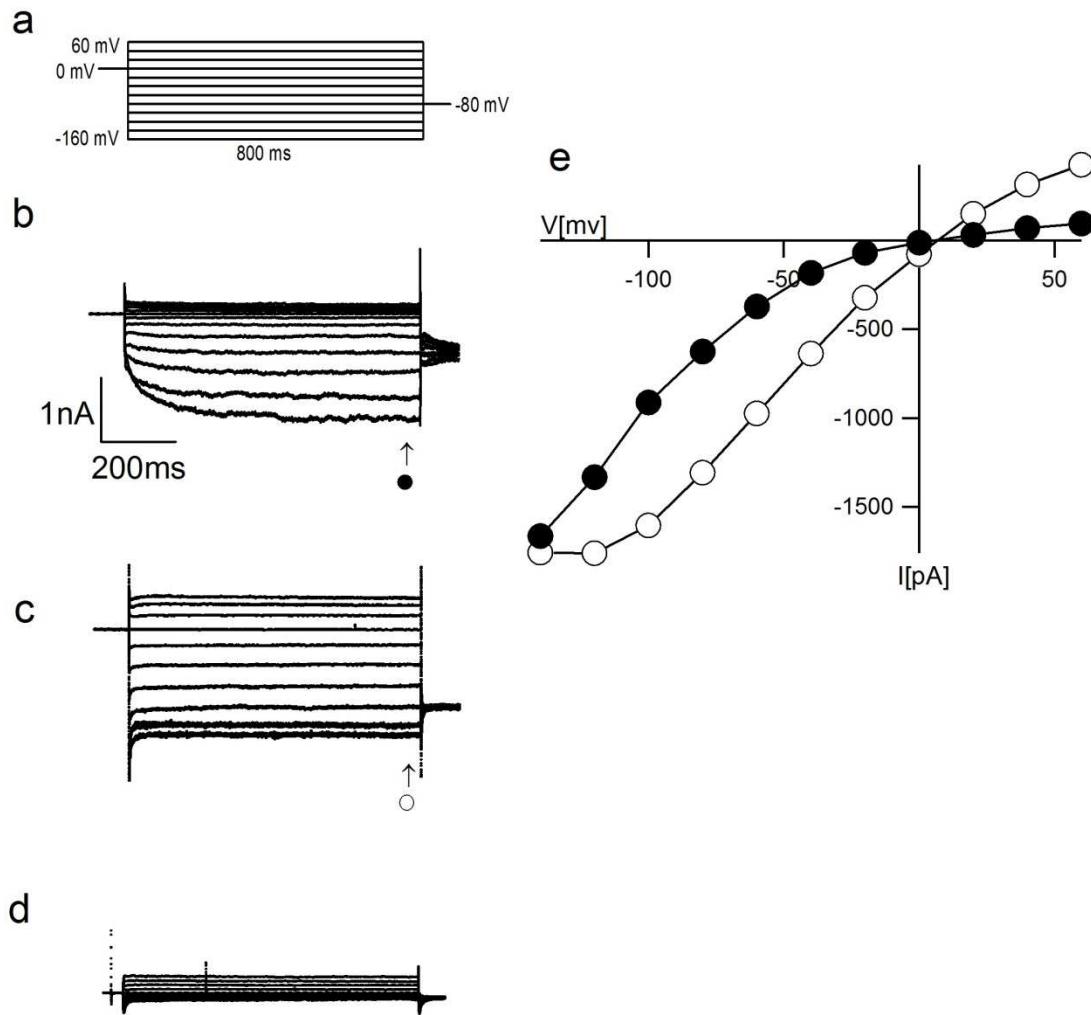


Abb.2.13: Veränderung der Kcv-typischen Leitfähigkeit bei der Kcv-A17-Mutante

Stromantworten einer Kcv-A17- (b), Kcv-wt- (c) und EGFP- (d) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (a) in einer 100 mM KCl-Badlösung. In den Strom-Spannungskurven (e) sind die stationären Ströme aus (b,●) und (c,○) dargestellt.

Somit verhält sich die Kcv-A17-Mutante auf den ersten Blick völlig Gegenteilig zum Wildtyp. So kommt es neben der zeitabhängigen Aktivierung auch zum Verlust der für Kcv so typischen negativen Kennlinie. Zerlegt man jedoch die Stromantwort in zwei Komponenten, nämlich in den instantanen Strom und den stationären Strom, und betrachtet deren I/V Beziehung, relativiert sich dieser erste Eindruck wieder. In Abbildung 2.14 ist die Strom-Spannungsbeziehung des instantanen und des stationären Stroms im Vergleich dargestellt. Betrachtet man den Verlauf der Strom-Spannungskurven, erkennt man, dass der instantane Strom der A17-Verlängerung eine negative Kennlinie aufweist, wie es auch für Kcv-wt typisch ist. Das heißt, dass die Mutation keinen Einfluss auf das schnelle *Gating* hat (Abenavoli *et al.* 2009), sondern lediglich die Eigenschaften des langsamen *Gates* verändert.

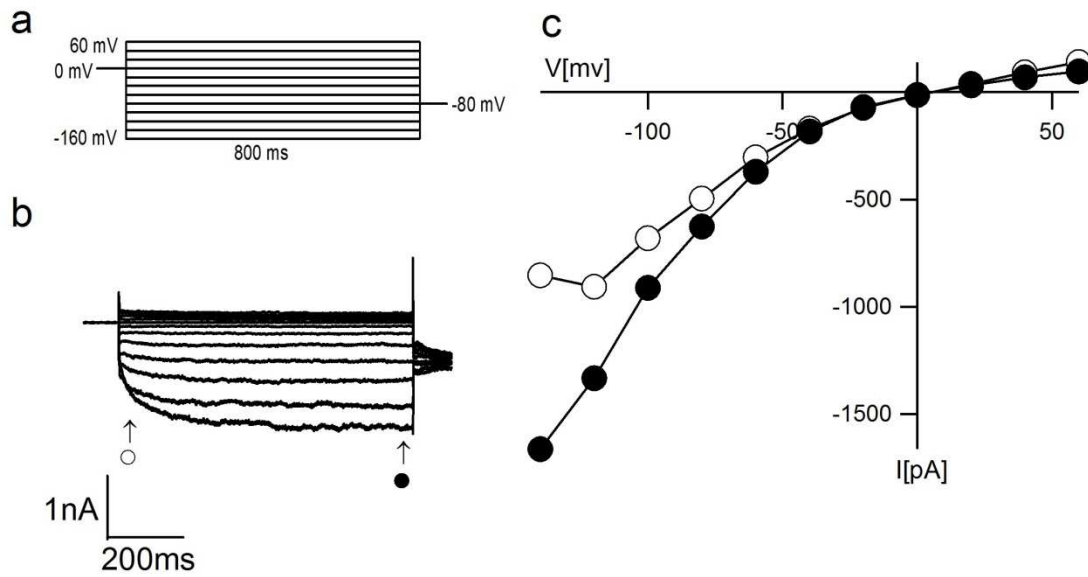


Abb. 2.14: Expression von Kcv-A17 in HEK293-Zellen

Darstellung der Stromantwort einer Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zelle (b) auf ein Standard-Pulsprotokoll (a). In den Strom-Spannungskurven (c) sind instantaner Strom (I_i , \circ) und stationärer Strom (I_{ss} , \bullet) aufgetragen.

Das gleiche Bild ergibt sich bei den Mutanten A16, A15 und A14, bei denen der instantane Strom stets die negative Kennlinie aufweist (Abb.2.15).

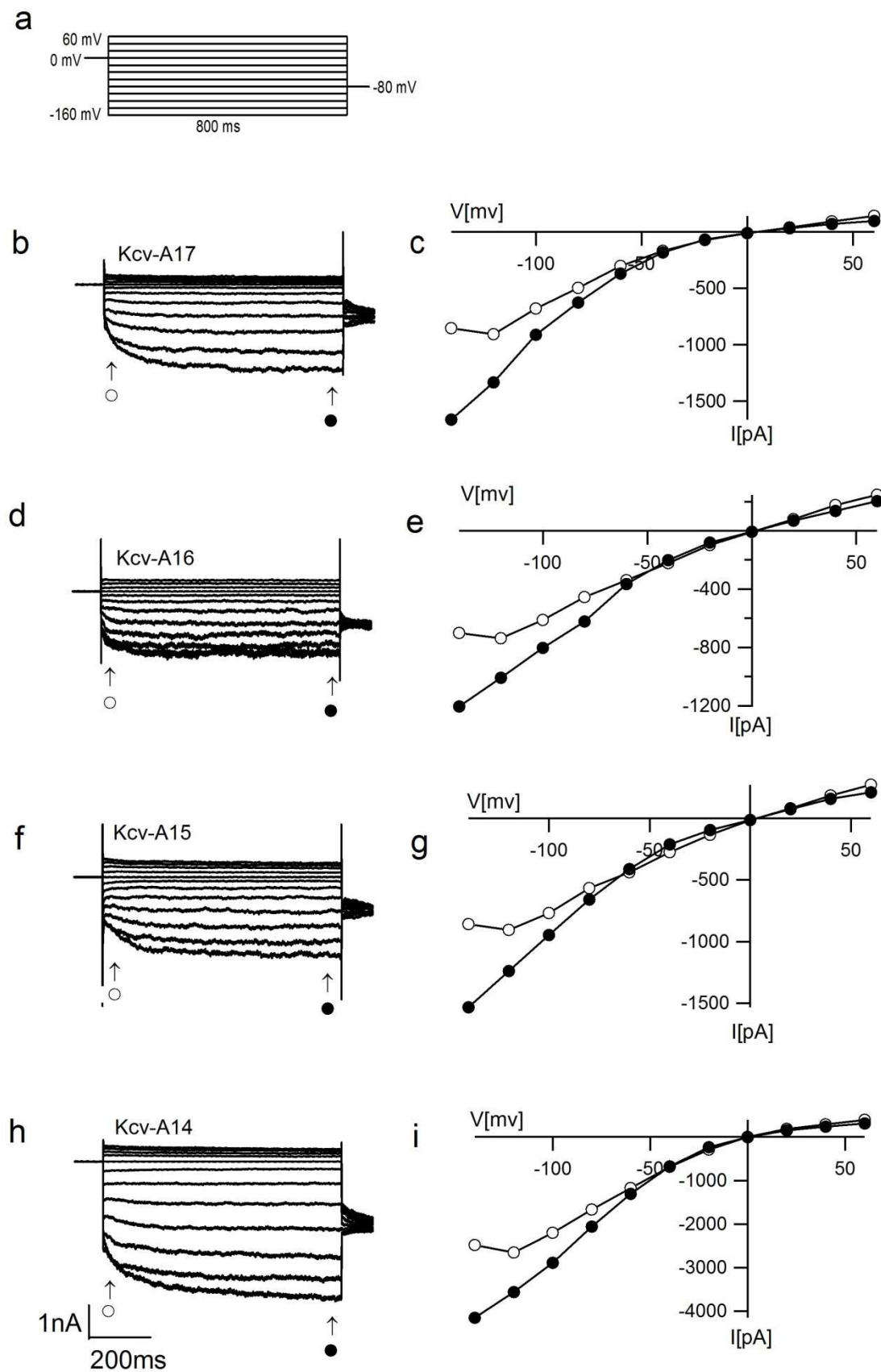


Abb. 2.15: Vergleich der instantanen Ströme mit den stationären Strömen der Verlängerungsmutanten

Darstellung der Stromantwort von HEK293-Zellen, die jeweils mit einer Verlängerungsmutante transfiziert wurden (b, d, f, h) auf ein Standard-Pulsprotokoll (a). In den jeweiligen Strom-Spannungskurven (c, e, g, i) sind instantaner Strom (I_i , \circ) und stationärer Strom (I_{ss} , \bullet) aufgetragen.

Der Verlauf der Stromantworten in Abbildung 2.14 und Abbildung 2.15 ist typisch für einen Einwärtsgleichrichter; mit zunehmend negativen Spannungen kommt es zu einer vergrößerten Leitfähigkeit mit einer steigenden trägen Aktivierung. Die Tatsache, dass es sich bei dieser Kcv-Mutante um einen Einwärtsgleichrichter handelt, ist umso beachtlicher, wenn man sich die minimale Größe des Kanals vor Augen führt. Somit verfügt er über alle nötigen Komponenten um nicht nur eine spannungsabhängige, sondern auch eine einwärtsgleichgerichtete Leitfähigkeit zu vermitteln.

Während eine Alanin-Insertion am cytosolischen Ende der TM1 eine große Veränderung in Bezug auf die Kinetik hervorruft, hat diese Mutation keinen nennenswerten Einfluss auf andere Eigenschaften des Kanals, wie die Ionenselektivität oder die Empfindlichkeit des Kanals gegenüber einem Blocker. Abbildung 2.16 zeigt, dass die Kcv-A17-Mutante auch weiterhin durch Barium blockiert werden kann. Die spannungsabhängige Blockierbarkeit durch Barium ist ein typisches Merkmal von Kaliumkanälen (Hille 2001). Dabei führt eine negative Membranspannung dazu, dass das zweiwertige Kation in die Pore gezogen wird und diese blockiert, sodass keinerlei Einwärtsstrom von Kaliumionen gemessen werden kann. Die Zugabe von 10 mM BaCl_2 zum Außenmedium führt bei der Kcv-A17-Mutante zu einer fast vollständigen Hemmung des Stroms (Abb.2.16d).

Auch die Selektivität der Kcv-A17 Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert. So kommt es nach einem Badlösungswechsel von 100 mM KCl zu 100 mM NaCl zu einer deutlichen Reduzierung des Einwärtsstroms und zu einer ausgeprägten Verschiebung des Umkehrpotentials in negative Richtung von durchschnittlich 51.4 ± 23 pA mV ($n=6$) (Abb.2.16c). Dies zeigt, dass auch in der Mutante die Leitfähigkeit eine vergleichbare Selektivität für Kalium-Ionen gegenüber Natrium-Ionen aufweist.

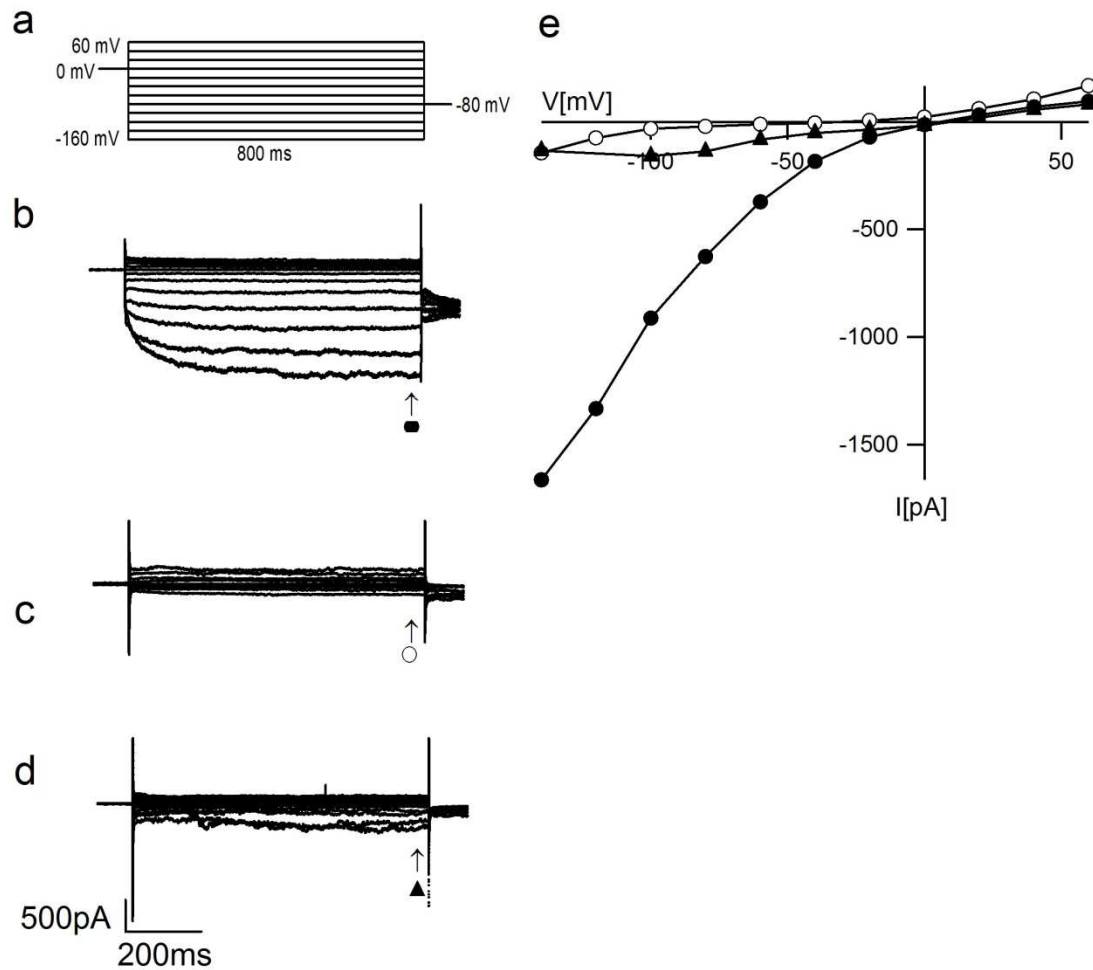


Abb. 2.16: Expression von Kcv-A17 in HEK293-Zellen

Dargestellt sind die Stromantworten einer Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zelle in einer 100mM KCl-Badlösung (b), in einer 100mM NaCl-Badlösung (c) und bei einem 10mM Barium-Block (d). In den Strom-Spannungskurven (e) sind die stationären Ströme von (b, ●), (c, ○) und (d, ◆) aufgetragen.

Auch die anderen funktionellen Alanin-Insertions-Mutanten weisen eine ähnliche Selektivität gegenüber Natrium und Blockierbarkeit durch Barium auf (Abb.2.17).

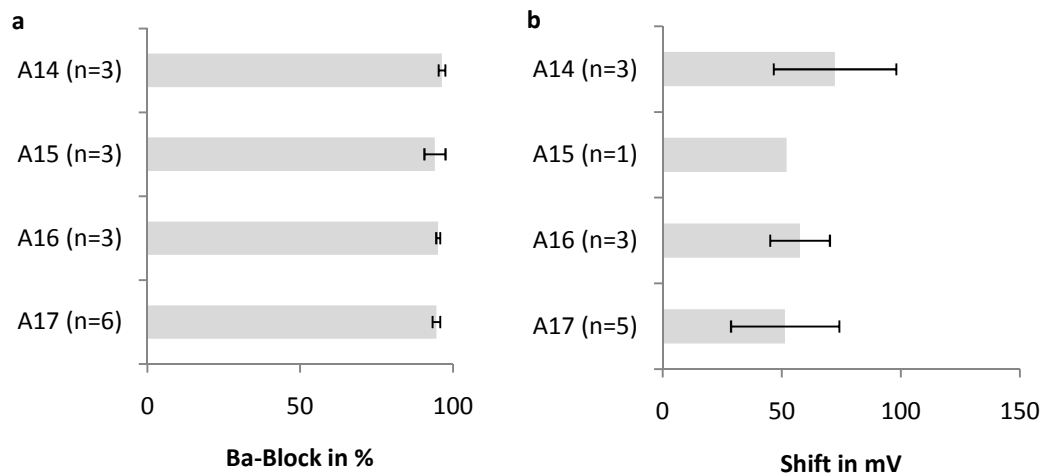


Abb. 2.17: Barium-Block und Natrium-Shift der Verlängerungsmutanten Kcv-A17-A14 in HEK293-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte eines 10 mM Barium-Blocks bei einer Referenzspannung von -140 mV (a) und der Shift des Umkehrpotentials nach einem Wechsel von 100 mM KCl zu 100 mM NaCl in der Badlösung (b) mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Es wurden insgesamt 30 Messungen der Kcv-A17-Mutante ausgewertet, wobei der durchschnittliche Strom bei einer angelegten Spannung von -140 mV bei $-1748 \text{ pA} \pm 938 \text{ pA}$ liegt. Dieser Wert liegt somit im Bereich der Stromamplitude, die auch durchschnittlich bei Kcv-wt-transfizierten HEK293-Zellen bei gleicher Spannung fließt, wo sie bei $-1773 \text{ pA} \pm 1020 \text{ pA}$ ($n=24$) liegt (siehe auch Abb.2.11).

Die durchschnittlichen Stromamplituden der anderen funktionellen Verlängerungsmutanten bei der Referenzspannung von -140 mV sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Während der Mittelwert des Stroms bei der Kcv-A16-Insertionsmutante mit $-1923 \text{ pA} \pm 1225 \text{ pA}$ ($n=7$) auf dem gleichen Niveau wie Kcv-wt und der Kcv-A17-Mutante liegt, ist die durchschnittliche Stromamplitude von Kcv-A15 mit $-1238 \text{ pA} \pm 363 \text{ pA}$ ($n=11$) leicht verringert. Besonders auffällig ist allerdings der deutliche Anstieg des mittleren Stroms der Kcv-A14-Mutante bei einer Spannung von -140 mV. Hier liegt der Mittelwert mit $-4002 \text{ pA} \pm 1912 \text{ pA}$ ($n=17$) mehr als doppelt so hoch wie beim Wildtyp.

Tabelle 2.1: Durchschnittliche Stromamplituden bei -140 mV

Aufgeführt sind die durchschnittlichen Stromamplituden der Kcv-Verlängerungsmutanten und von Kcv-wt bei einer Referenzspannung von -140 mV mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Kcv-Variante	Anzahl der Messungen	mittlerer Strom bei -140 mV	Standardabweichung
Kcv-A14	17	-4002	1912
Kcv-A15	11	-1238	363
Kcv-A16	7	-1923	1226
Kcv-A17	30	-1748	938
Kcv-wt	24	-1773	1020

Um die Spannungsabhängigkeit der trägen Aktivierung der Verlängerungsmutanten näher zu analysieren wurden die *Tail*-Ströme, wie sie beispielsweise in Abbildung 2.14 erkennbar sind, herangezogen. In Abbildung 2.18 sind diese *Tail*-Ströme noch einmal vergrößert dargestellt.

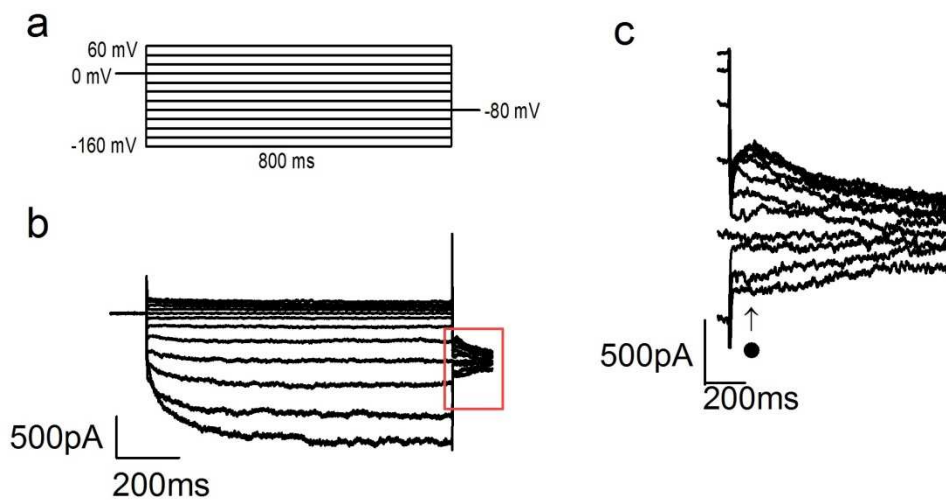


Abb. 2.18: *Tail*-Ströme von Kcv-A17 transfizierten HEK293-Zellen

Darstellung der Stromantwort einer Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zelle (b) auf ein Standard-Pulsprotokoll (a). In der vergrößerten Darstellung (c) sind die *Tail*-Ströme abgebildet.

Der Verlauf dieser *Tail*-Ströme zeigt, dass sie zu Beginn des Spannungssprunges auf -80 mV eine unterschiedliche Größe aufweisen und dass die Amplitude der *Tail*-Ströme von dem jeweiligen vorhergehenden Testpotential abhängt. Plottet man die initialen *Tail*-Ströme (●) als Funktion der vorhergehenden Testspannung erhält man die Aktivierungskurve in Abbildung 2.19. Diese Daten lassen sich mit der Boltzmannfunktion (Gleichung 1) beschreiben (Gazzarrini *et al.*, 2002).

Gleichung (1):
$$P = P_{\max} / (1 + \exp(zF/RT \cdot (V_{1/2} - V))) + b$$

mit: P_{\max} – maximale Offenwahrscheinlichkeit; z – Spannungsabhängigkeitskoeffizient; $V_{1/2}$ – Spannung für halbmaximale Aktivierung; V – Referenzspannung; F – Faraday-Konstante; T – absolute Temperatur; R – Gaskonstante; b – Offset (Fraktion von bereits geöffneten Kanälen)

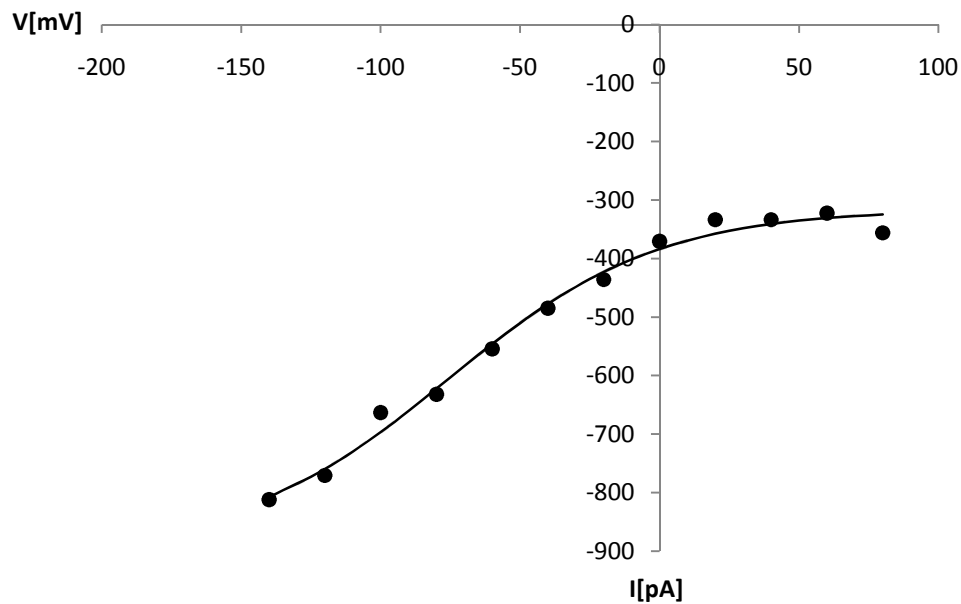


Abb. 2.19: Boltzmann-Fit der Tail-Ströme von Kcv-A17

Dargestellt sind die Tail-Ströme einer Kcv-A17 transfizierten HEK293-Zelle als Funktion der vorhergehenden Testspannung. Die Werte wurden mit der Boltzmannfunktion gefittet (blaue Kurve).

Anhand dieses Fits erhält man in dem gezeigten Beispiel einen Spannungsabhängigkeitskoeffizienten $z=0.66$ und eine Spannung für die halbmaximale Aktivierung von ca. -75 mV. Die gleiche Analyse wurde für 6 weitere Kcv-A17 transfizierte HEK-Zellen durchgeführt; die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen sind in Abbildung 2.20 zusammengefasst. Die Analyse der drei anderen Mutanten zeigt ähnliche Werte für den Spannungsabhängigkeitskoeffizienten, jedoch leicht variierende Werte der halbmaximalen Aktivierung (Abb. 2.20).

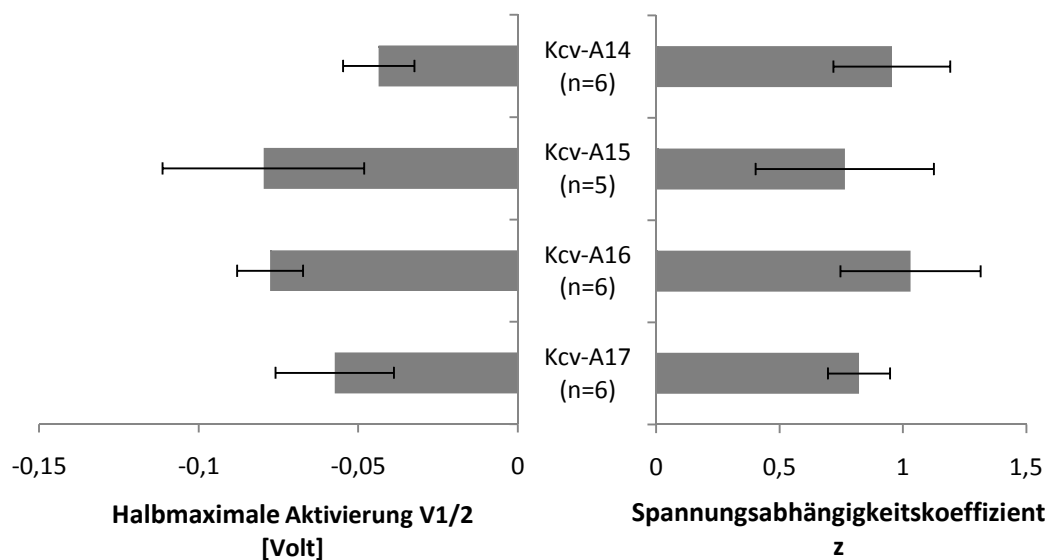


Abb. 2.20: Mittelwerte der Boltzmann-Fits der Tail-Ströme von Kcv-A17 – Kcv-A14

Dargestellt sind die Mittelwerte des Spannungsabhängigkeitskoeffizienten und der halbmaximalen Aktivierung der Tailströme von Kcv-A17, Kcv-A16, Kcv-A15 und Kcv-A14 transfizierten HEK293-Zellen mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Eine „ANOVA“ Varianzanalyse für die in Abbildung 2.20 dargestellten Werte des Boltzmann-Fits führt für den Spannungsabhängigkeitskoeffizienten z zu einem p -Wert von 0,327 und liegt somit deutlich über 0,05, was einer Signifikanzzahl von 5% entspricht. Somit weist der Spannungsabhängigkeitskoeffizient z keinen signifikanten Unterschied aller Verlängerungsmutanten untereinander auf. Führt man allerdings die „ANOVA“ Varianzanalyse für die Werte der Spannung, bei der es zur halbmaximalen Aktivierung kommt, durch, so zeigen sich signifikante Unterschiede. Man erhält einen p -Wert von 0,0127. Dieser Wert liegt deutlich unter 0,05 und belegt die signifikanten Abweichungen der halbmaximalen Aktivierung aller Verlängerungsmutanten untereinander. Demnach kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass die Alanin-Insertion an allen 4 Positionen die gleichen Veränderungen im Bereich des langsamen Gates in Bezug zum Spannungsabhängigkeitskoeffizienten induziert. Die halbmaximale Aktivierung der *Tail*-Ströme variiert jedoch positionsabhängig.

Betrachtet man diese signifikanten positionsabhängigen Abweichungen der $V_{1/2}$ -Werte der vier Mutanten näher, erkennt man, dass den Abweichungen ein Muster zugrunde liegt. Dabei verschiebt sich der $V_{1/2}$ -Wert in Abhängigkeit von der Insertionsposition zuerst in negative Richtung um dann wieder in positive Richtung zu wandern. Da es sich bei der TM1 um eine α -Helix handelt, besteht die Möglichkeit, dass die positionsabhängigen Abweichungen der $V_{1/2}$ -Werte die Architektur der α -Helix widerspiegeln. Um diese Hypothese zu testen wurden die $V_{1/2}$ -Werte mit der folgenden Sinusfunktion (Gleichung 2) gefittet.

Gleichung (2): $V_{1/2} = \sin(\alpha + c) \cdot A$

mit: $V_{1/2}$ - Spannung für halbmaximale Aktivierung; α – Winkel der Sinusfunktion; A – Amplitude der Sinusfunktion; c – Konstante

Die $V_{1/2}$ -Werte aus Abbildung 2.20 sind in Abbildung 2.21 in Abständen von 100 Grad geplottet. Diese Auftragung entspricht einer Anordnung, bei der aufeinanderfolgende Aminosäuren in einem Winkel von 100 Grad zueinander stehen und auf diese Weise eine α -helikale Transmembrandomäne bilden. Die $V_{1/2}$ -Daten lassen sich in dieser Anordnung mit der oben angegebenen Gleichung (Gleichung 2) fitten. Die Sinuskurve hat in diesem Fall eine Amplitude von 77 mV und eine Konstante c von 18.

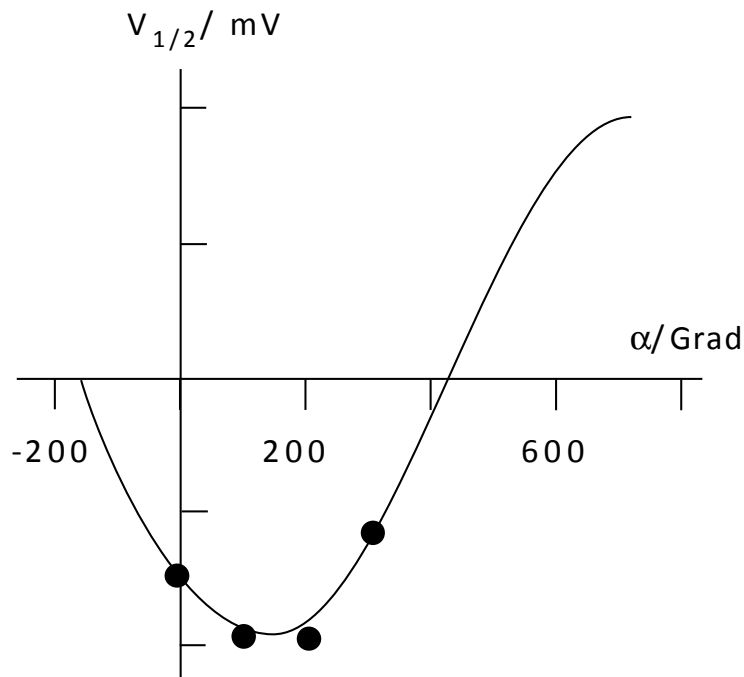


Abb. 2.21: Halbmaximale Aktivierung der Kcv-A17-A14 Mutanten

Dargestellt sind die $V_{1/2}$ -Werte aus Abbildung 2.20, die in Abständen von 100 Grad aufgetragen sind. Die Sinuskurve konnte anhand von Gleichung 2 berechnet werden und hat eine Amplitude von 77 mV und eine Konstante c von 18.

Die Daten in Abbildung 2.21 zeigen, dass die $V_{1/2}$ -Werte mit einer Sinusfunktion, die die Anordnung von Aminosäuren in einer α -Helix widerspiegelt, gefittet werden können. Dieser positive Befund unterstützt die Vorstellung, dass die Orientierung von Aminosäuren in der TM1-Helix für den *Gating*-Prozess entscheidend ist.

Vergleicht man die durchschnittlichen Werte der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ und des Spannungsabhängigkeitskoeffizienten z der vier funktionellen Alanin-Insertions Mutanten mit den Werten des Wildtyps aus Messungen von *Xenopus* Oozyten, zeigt sich kein wesentlicher Unterschied. In Oocyten weist die träge Leitfähigkeit von Kcv-wt einen Spannungsabhängigkeitskoeffizienten von 0.8 auf und die halbmaximale Aktivierung liegt bei -67 mV (Gazzarrini *et al.*, 2002). Die Übereinstimmung der Werte deutet darauf hin, dass die Alanin-Insertion im HEK293-Expressionssystem den Phänotypen von Kcv wiederherstellt, der auch in Oocyten registriert wird.

Trägt man die durchschnittliche halbmaximale Aktivierung der Verlängerungsmutanten gegen die durchschnittliche Stromamplitude bei -140mV auf, erkennt man den Zusammenhang der durchschnittlichen Stromamplitude mit der Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der jeweiligen Verlängerungsmutante (Abb.2.22). So weist die Kcv-A14 Mutante demnach eine deutlich erhöhte durchschnittliche Stromamplitude bei -140 mV auf, da die halbmaximale Aktivierung signifikant ins Positive verschoben ist. Auf der anderen Seite hat die halbmaximale Aktivierung der Mutante mit der geringsten durchschnittlichen Stromamplitude, die Kcv-A15-Mutante, den negativsten Wert aller Mutanten.

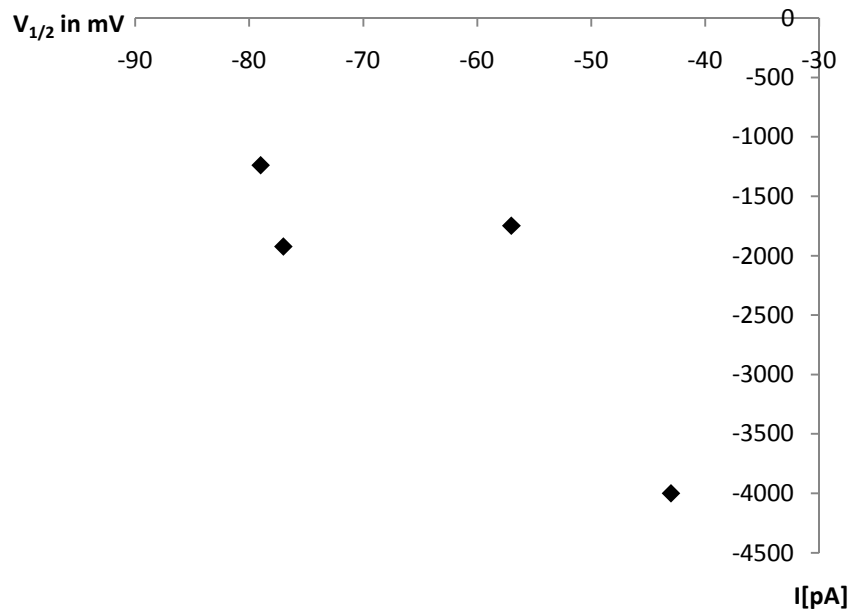


Abb. 2.22: Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Verlängerungsmutanten

Dargestellt ist die Abhängigkeit der durchschnittlichen Stromamplitude bei -140 mV von der halbmaximalen Aktivierung der jeweiligen Mutante.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Alanin-Insertion am cytoplasmatischen Ende der TM1 große Veränderungen der Kinetik der Stromantwort induziert. Wie die vorangegangenen Experimente zeigen, deutet dies auf eine direkte Beteiligung des mutierten Bereichs der TM1 am langsamen *Gating*-Prozess hin. Mechanistische Grundlage könnte eine erhöhte Flexibilität der TM1 am cytoplasmatischen Ende und somit eine größere Dynamik sein. Im folgenden Teil dieser Arbeit soll die molekulare Grundlage des veränderten *Gating*-Prozesses näher untersucht werden. Da die Grundlage des *Gatings* und dessen Kinetik stets dynamische Prozesse sind, besteht eine unmittelbare Abhängigkeit zur Temperatur. Diese Temperaturabhängigkeit wird im Folgenden als Werkzeug zur weiteren Analyse genutzt.

2.3. Temperaturabhängigkeit der Kanalaktivität

Aktive Ionenkanäle fluktuieren stochastisch zwischen einem geschlossenen und einem offenen Zustand, ein Prozess der als *Gating* bezeichnet wird (Abschnitt 1.2.2.). Kanäle sind demnach dynamische Strukturen, die unter bestimmten Bedingungen einen Konformationswechsel eingehen, der zum *Gating* und somit zum Öffnen oder Schließen des *Gates* führt. Es ist eine interessante Herausforderung, den Mechanismus, der hinter diesen Bewegungen steckt, zu verstehen.

Um ihre jeweilige Funktion zu erfüllen, vollziehen Proteine ganz spezifische Konformationswechsel. Die Art einer solchen Veränderung der Proteinstruktur kann sehr unterschiedlich sein. Ein Konformationswechsel kann Auswirkungen auf große Bereiche eines Proteins haben, wodurch zwangsläufig unzählige Interaktionen innerhalb des Proteins selbst aber auch mit den umgebenden Molekülen moduliert, abgeschwächt oder völlig aufgehoben werden. Jedoch kann ein Konformationswechsel auch nur eine einzige Aminosäure betreffen und somit nur sehr lokale Auswirkungen haben. Ein Beispiel für einen solchen lokalen Konformationswechsel wäre die dynamische Ausbildung von Salzbrückenbindungen am intrazellulären Eingang der Cavität von Kcv (siehe auch 1.3.3).

Alle Arten von Konformationswechseln haben jedoch eines gemeinsam: damit ein Protein einen solchen Konformationswechsel durchführen kann, muss eine gewisse Energie aufgebracht werden. Wie groß der Betrag der Energie ist, der aufgewendet werden muss, ist letztlich durch die Sequenz des Proteins und seine Umgebung bestimmt, ist also eine intrinsische Eigenschaft des molekularen Aufbaus. Die Population sowohl der Energie-„Basins“ als auch der Barrieren, die diese verbinden, unterliegt hingegen den Gesetzen der Thermodynamik: Je höher die Temperatur, desto leichter werden höherenergetische Bereiche der Potentialfläche erreicht. In diesem Sinne ist auch die Kinetik von konformationellen Übergängen, die im Falle von Ionenkanälen mit *Gate*-Zuständen zusammenhängen, von der Temperatur abhängig. Über die Arrhenius-Gleichung (Atkins, 2006) lässt sich ein quantitativer Zusammenhang zwischen gemessener Kinetik (d.h. von zeitabhängigen Strömen) und der Energiebarriere zwischen beteiligten konformationellen Zuständen herstellen. Dies gelingt durch temperaturabhängige Messungen.

Ein entscheidender Parameter der Thermodynamik ist die Temperatur. Daher ist die Temperatur ein wichtiger Faktor, der das *Gating* eines Kanals direkt beeinflusst. Diese Temperatur-Abhängigkeit ist ein Schlüssel zum Verständnis der Kanal-Kinetik.

In diesem Teil der Arbeit soll die Temperaturabhängigkeit der Kinetik des Kcv-Kanals genauer untersucht werden.

2.3.1. Temperaturabhängigkeit der Kcv-A17-Mutante

Wie oben bereits ausführlich beschrieben, tritt bei der Kcv-A17-Mutante eine sehr interessante Veränderung der Kinetik auf. Im Gegensatz zur Kcv-wt-Kinetik, wo es bei negativen Spannungen zu einer schnellen Inaktivierung kommt, ist es bei der Kcv-A17-Mutante dagegen völlig gegenteilig. So kommt es bei negativen Spannungen ab ca. 100 mV zu einer deutlich ausgeprägten Aktivierung, wobei der instantane Strom signifikant kleiner als der stationäre Strom ist (Abb.2.13). Diese Veränderung lässt sich daher auf eine direkte oder indirekte Beteiligung der mutierten Position am *Gating* zurückführen.

In Abbildung 2.23 ist der Unterschied von Kcv-wt und der Kcv-A17-Mutante bei einer Temperatur von 22°C deutlich zu erkennen (siehe auch Abb.2.13).

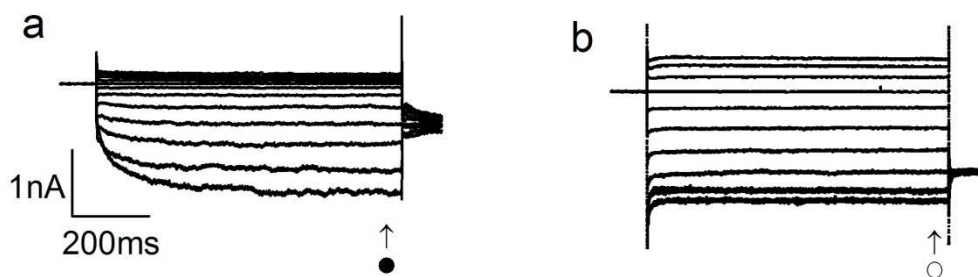


Abb.2.23: Unterschied von Kcv-wt und der Kcv-A17-Mutante bei Raumtemperatur

Stromantworten einer Kcv-A17- (a) und einer Kcv-wt- (b) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll in einer 100 mM KCl-Badlösung bei Raumtemperatur.

Die ausgeprägte aktivierende Kinetik versetzt uns in die Lage einen Blick auf die Temperaturabhängigkeit des zugrunde liegenden Prozesses zu werfen. So ist es bei der Kinetik der A17-Mutation möglich, neben der Messung der Stromgröße, auch die Veränderung der Zeitkonstanten (Tau) dieser Aktivierung, in Abhängigkeit der Temperatur zu beobachten.

Aus der Zeitkonstante der Aktivierung kann man anhand der Arrheniusgleichung (Gleichung 3) die für diesen Prozess benötigte Aktivierungsenergie ermitteln.

Gleichung (3):
$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}}$$

mit: k – Reaktionsgeschwindigkeitskonstante; A – präexponentieller Faktor; E_A – Aktivierungsenergie; T – absolute Temperatur; R – universelle Gaskonstante

In unserem Fall entspricht dabei die Zeitkonstante (Tau, τ_1) der langsamen Aktivierung der Stromantwort dem Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (k).

Gleichung (4): $k = 1/\tau_1$ bzw. $\tau_1 = 1/k$

mit: k – Reaktionsgeschwindigkeitskonstante; τ_1 – Zeitkonstante für die langsame Aktivierung

Durch die Bestimmung von τ_1 bei unterschiedlichen Temperaturen lässt sich somit die Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsenergie ermitteln.

Im Folgenden werden daher die Stromantworten von Kcv-A17-exprimierenden HEK293-Zellen, die bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen wurden, dargestellt. Dies stellte allerdings gewisse Anforderung an den Messaufbau, denn dabei war es äußerst wichtig, den Wechsel der Temperatur möglichst schnell durchführen zu können, so dass die gemessenen Veränderungen der Kinetik ausschließlich als Auswirkung der Temperatur interpretiert werden können. Hätte der Aufbau des Temperaturgradienten zu viel Zeit in Anspruch genommen, müsste auch in Erwägung gezogen werden, dass die Ergebnisse durch Stressantworten der Zelle ausgelöst oder beeinflusst werden könnten. Daher wurde die 100 mM-KCl-Badlösung in separaten Gefäßen stark aufgeheizt bzw. abgekühlt und über einen Zulauf in das Messschälchen gebracht. Mit einem Temperatursensor wurde direkt in dem Messschälchen die exakte Temperatur gemessen. Durch die Einstellung der Zulaufgeschwindigkeit der unterschiedlich vortemperierten Badlösungen konnte die Temperatur sehr schnell eingestellt werden. Auf diese Weise war es möglich, innerhalb weniger Minuten die Stromantworten ein und derselben Zelle bei Temperaturen in einem Bereich von ca. 10°C – 40°C zu messen.

In Abbildung 2.24 sind exemplarisch die Stromantworten einer Zelle auf einen Spannungssprung ausgehend von einer Ruhespannung von 0 mV auf die Referenzspannung von -140 mV bei 3 verschiedenen Temperaturen dargestellt.

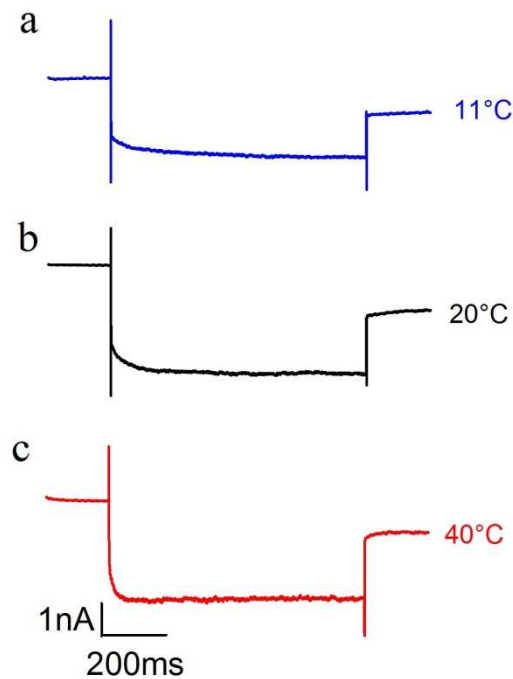


Abb.2.24: Unterschiede der Stromantworten einer Kcv-A17-transfizierten HEK-Zelle bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt sind die Stromantworten einer Kcv-A17- transfizierten HEK293-Zelle bei einem Spannungssprung von 0 mV auf zunächst -140 mV und im dritten Schritt auf -80 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung bei 3 verschiedenen Temperaturen.

Schon bei dieser Form der Darstellung, die die unbearbeiteten Rohdaten zeigt, kann man deutlich erkennen, dass mit veränderter Temperatur auch die Form der Aktivierung variiert: Je höher die Temperatur, desto schneller die Aktivierung (i.e. desto kleiner Tau, bzw desto grösser k in Gleichung 3). Eindeutig sichtbar wird diese Veränderung sobald man die Kurven normiert und übereinander legt (Abb.2.25).

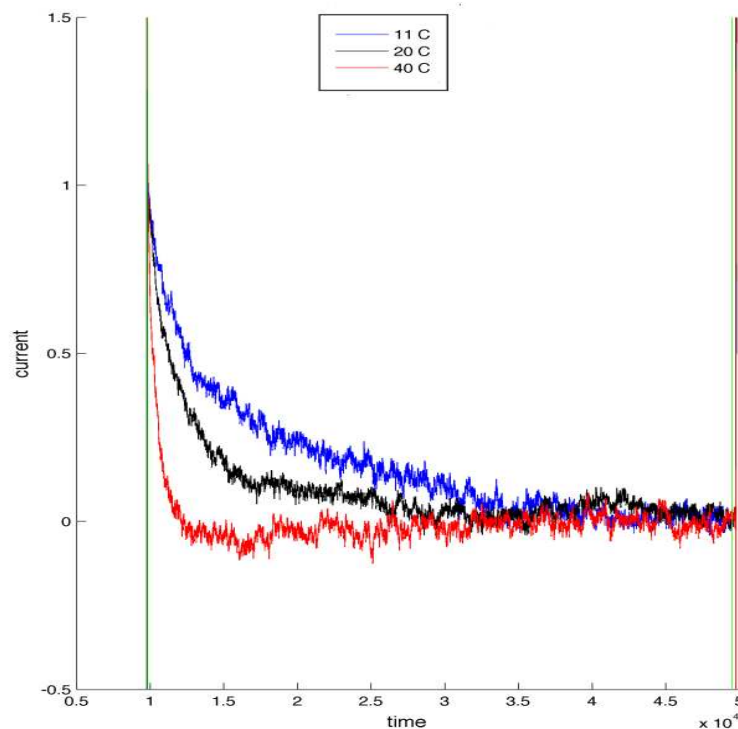


Abb.2.25: Unterschiede der Stromantworten einer Kcv-A17-transfizierten HEK-Zelle bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt sind die Stromantworten einer Kcv-A17- transfizierten HEK293-Zelle auf eine Referenzspannung von -140 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung bei 3 verschiedenen Temperaturen. Dabei sind die Stromantworten so normiert, dass der instantane Strom $I_i = 1$ und der stationäre Strom $I_{ss} = 0$ entspricht.

Die vor allem in Abbildung 2.25 schon optisch erkennbaren temperaturabhängigen Unterschiede der Zeitkonstanten werden durch die quantitative Analyse bestätigt. Dabei wurden die Zeitkonstanten (τ) mit einer Exponentialfunktion (Gleichung 5) ermittelt.

Gleichung (5):
$$I(t) = a_0 + a_1 (1 - \exp(-t/\tau_1))$$

mit: τ_1 – Zeitkonstante für die langsame Aktivierung; a – Amplitude; t – Zeit

Abbildung 2.26 zeigt, dass eine einfache Exponentialfunktion hinreichend ist, um den Verlauf der Aktivierung zu beschreiben.

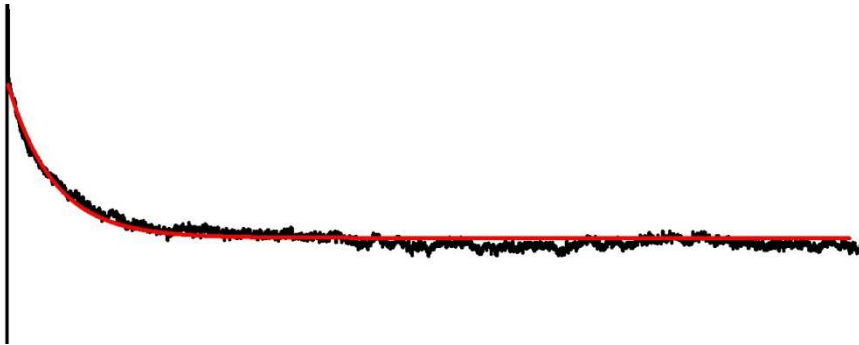


Abb.2.26: Exponentieller Fit der Stromantwort mit Fitmaster™

Dargestellt ist ein exemplarischer Fit der Stromantwort einer Kcv-A17 exprimierenden HEK293-Zelle bei einer Referenzspannung von -140 mV. Der Fit erfolgt in einem Bereich von 0,8-784 ms des Spannungspulses.

In Abbildung 2.27a sind die ermittelten Zeitkonstanten bei der Referenzspannung von -140 mV von vier verschiedenen Zellen über einen Temperaturbereich von 10°C-44°C aufgetragen. Auffällig ist, dass bei allen 4 Zellen vor allem im Temperaturbereich oberhalb von 20°C die Zeitkonstanten sehr einheitliche Werte haben. Nur im Bereich von sehr niedrigen Temperaturen sind etwas größere Abweichungen zu erkennen. Allerdings liegen diese Schwankungen in einem Bereich in dem die Aktivierungskurven bereits einen derart flachen Verlauf haben, dass sie mit einer einzelnen Zeitkonstante nicht mehr optimal gefittet werden können. Diese Tendenz wird auch durch die Auftragung der Mittelwerte bestätigt. Dazu wurden alle gefitteten Zeitkonstanten eines festgelegten Temperaturbereichs gemittelt und mit den entsprechenden Fehlerbalken in x- und y-Richtung aufgetragen (Abb.2.27b). Auch in dieser Darstellung kann man deutlich erkennen, dass die Zeitkonstanten oberhalb einer Temperatur von 20°C sehr homogen verteilt sind. Wogegen sie besonders bei niedrigen Temperaturen größere Standardabweichungen aufweisen.

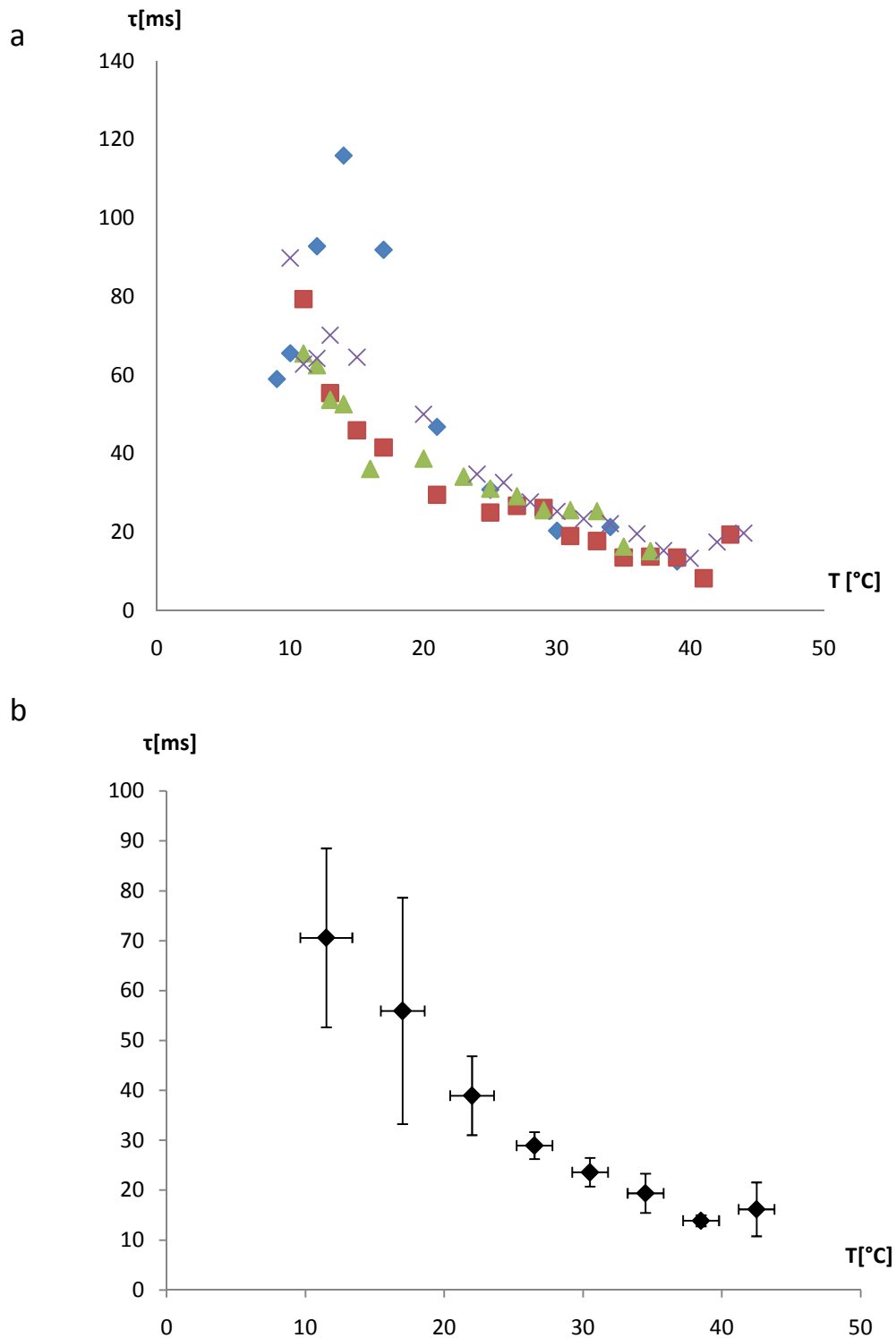


Abb.2.27: Zeitkonstanten der Stromantworten von Kcv-A17-transfizierten HEK-Zellen bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt sind die Zeitkonstanten der Stromantworten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei einer Referenzspannung von -140 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung in einem Temperaturbereich von 10-44°C. In Teilabbildung (a) sind die Zeitkonstanten der einzelnen 4 Zellen dargestellt. In Teilabbildung (b) sind die Mittelwerte aller gemessenen Zeitkonstanten innerhalb eines festgelegten Temperaturbereichs mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgetragen.

Betrachtet man Abbildung 2.27, erkennt man die exponentielle Abhängigkeit der Zeitkonstanten zur Temperatur. Daher bietet sich eine Darstellung als Arrhenius-Plot an, in dem die Zeitkonstante τ logarithmisch gegen den Kehrwert der Temperatur aufgetragen wird. In dieser Art der Darstellung wird die exponentiell zur Temperatur abhängige Zeitkonstante τ annähernd auf einer Geraden abgebildet (2.28). Dadurch nimmt Gleichung 3 die Form einer Geraden an:

Gleichung (3.1): $\ln(1/\tau) = \ln(A) - E_A / R * 1/T$

mit: τ – Zeitkonstante; A – präexponentieller Faktor; E_A – Aktivierungsenergie; T – absolute Temperatur; R – universelle Gaskonstante

Aus der Steigung lässt sich nun leicht die Aktivierungsenergie E_A bestimmen und der Vorfaktor A aus dem Achsenabschnitt.

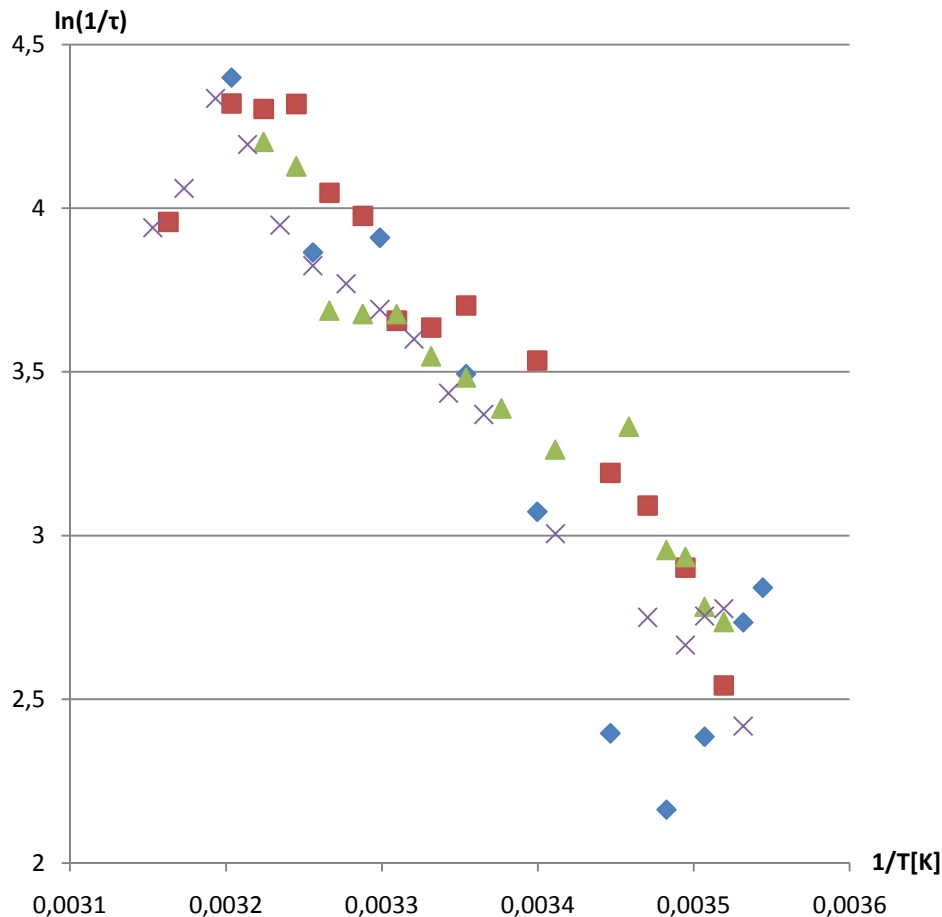


Abb.2.28: Arrhenius-Plot der Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt ist ein Arrhenius-Plot der Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei einer Referenzspannung von -140 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung.

Um die eventuell auftretenden Fit-Artefakte zu minimieren, bietet sich auch im Arrhenius-Plot die Darstellung der Mittelwerte an (Abb.2.29). Dabei erhält man die Mittelwerte, indem man alle Messpunkte innerhalb eines definierten Temperaturbereichs mittelt (siehe auch Abb.2.27b). Auch wenn man dadurch weniger Messpunkte erhält, sollte es später leichter fallen die Steigung der Regressionsgeraden zu ermitteln und Aussagen über den mittleren Fehler zu treffen. Zur weiteren Analyse des mittleren Fehlers wird eine Fehlerfortpflanzung (Taylor, 1996) durchgeführt, wobei der x-Fehler nicht weiter berücksichtigt wird. Auf diese Weise ist es möglich die Aktivierungsenergie, die diesem Prozess zugrunde liegt, zu bestimmen.

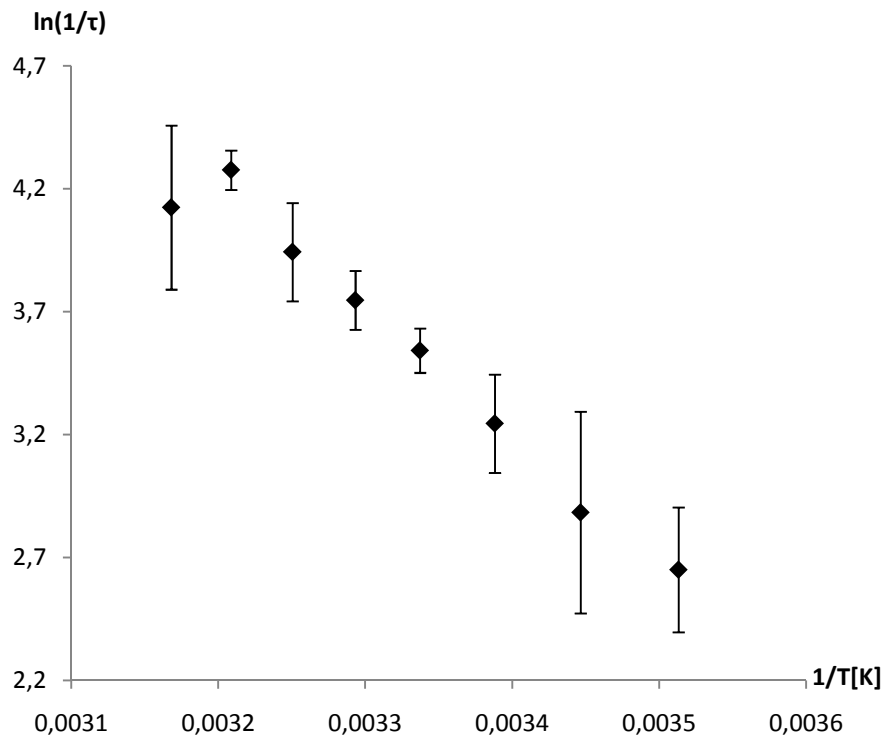


Abb.2.29: Arrhenius-Plot der Mittelwerte der Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt ist ein Arrhenius-Plot der Mittelwerte aller Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei einer Referenzspannung von -140 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung mit den entsprechenden Fehlerindikatoren.

Um die Spannungsabhängigkeit dieses Prozesses beurteilen zu können, wurde die gleiche Auswertung auch bei einer Spannung von -120 mV durchgeführt. In Abbildung 2.30 ist der Arrhenius-Plot der entsprechenden Mittelwerte dargestellt.

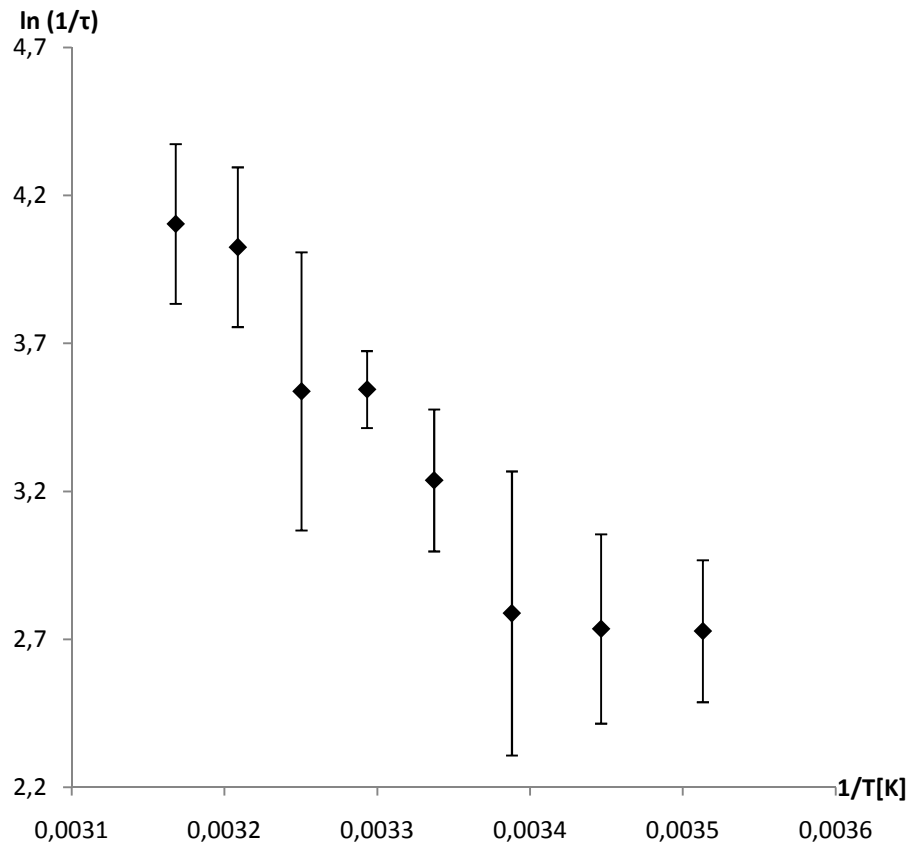


Abb.2.30: Arrhenius-Plot der Mittelwerte der Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt ist ein Arrhenius-Plot der der Mittelwerte aller Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei einer Referenzspannung von -120 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung mit den entsprechenden Fehlerindikatoren.

Aufgrund der langsameren Aktivierung des Stroms der Kanäle bei der niedrigeren Spannung von -120 mV und der daraus resultierenden Schwierigkeiten eines genauen Fits, ergibt die Auftragung der Werte im Arrhenius-Plot für die Spannung von -120 mV auf den ersten Blick größere Schwankungen als bei der Spannung von -140 mV. Allerdings zeigt die Berechnung der Fehlerfortpflanzung, dass sich die Aktivierungsenergien signifikant voneinander unterscheiden. Aus einer Regressionsgeraden in Abbildung 2.29 erhält man für die Spannung von -140 mV eine Aktivierungsenergie von $45 \pm 2,5$ KJ/mol. Dagegen ist die Aktivierungsenergie bei einer Spannung von -120 mV mit $36 \pm 3,6$ KJ/mol signifikant unter der von -140 mV. Mit etwa 5,5 % bei -140 mV und 10% bei -120 mV fällt auch der Fehler nach Berechnung der Fehlerfortpflanzung (Taylor, 1996) äußerst gering aus. Bemerkenswert ist, dass der Wert für die Aktivierung bei einer Spannung von -120 mV niedriger ist als bei -140 mV. Daraus ist zu schließen, dass die Energiebarriere spannungsabhängig ist und dass höhere Spannungen die benötigte Aktivierungsenergie erhöhen.

Mit Werten von $45 \pm 2,5$ KJ/mol für -140 mV bzw. $36 \pm 3,6$ KJ/mol für -120 mV liegt die Aktivierungsenergie, die diesem Prozess zugrunde liegt, deutlich unter dem Wert, der für eine größere konformationelle Änderung nötig wäre (Hazama *et al.*, 1997). Allerdings konnte bereits für andere Proteine gezeigt werden, dass die benötigte Energie, die für das Aufbrechen von Salzbrücken

innerhalb der Tertiär- und Quartär-Struktur von Proteinen bei ca. 30 KJ/mol liegt (Gruia *et al.*, 2004). Somit entsprechen die Werte der Aktivierungsenergie des zugrundeliegenden *Gating*-Prozesses der Energie, die aufgebracht werden muss, um etwa die Interaktion von zwei Salzbrückenpartnern aufzulösen.

Auch der Arrhenius-Vorfaktor (A aus Gleichung 3) passt zeitlich zu einer Salzbrückendynamik. Bei -140 mV liegt er bei $2.37 \pm 2.42 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ und bei -120 mV bei $5.36 \pm 7.83 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Der Unterschied von Faktor 50 zwischen beiden ist nicht signifikant, da der Fehler ohnehin ca. 100% beträgt. Dies ist auf die exponentielle Verstärkung $\ln A \rightarrow A = e^{(\ln A)}$ zurückzuführen. Der Kehrwert des Arrhenius-Vorfaktors entspricht den Zeitskalen für die zugrundeliegende Salzbrückendynamik. Dementsprechend liegen die typischen Zeitskalen für die Frequenz der Salzbrückenkinetik also zwischen $0.4 \pm 0.4 \text{ ns}$ und $18.7 \pm 27.3 \text{ ns}$. Dies entspricht auch dem Zeitfenster, das aus vorangegangenen Simulationen ermittelt wurde (Tayefeh *et al.*, 2007). Sollte die Salzbrücke in den langsamen *Gating*-Prozess involviert sein, deutet dies darauf hin, dass durch die Salzbrücke neben dem Öffnen und Schließen des *Gates* auch die Ionendurchflussrate im geöffneten Zustand spannungsabhängig reguliert wird.

Neben der Betrachtung der Kinetik und der Zeitkonstante der Stromantwort ist auch die Abhängigkeit der Stromamplitude von der Temperatur von großem Interesse. In Abbildung 2.31 sind die normierten Stromamplituden der trägen Stromkomponente bei einer Referenzspannung von -140 mV gegen die Temperatur aufgetragen. Dabei wurde zunächst der Stromunterschied ermittelt, der zwischen dem instantanen Strom und dem stationären Strom herrscht, also der Strom, der ausschließlich auf der aktivierenden Kinetik beruht ($\Delta I = I_{\text{stat}} - I_{\text{inst}}$). Zur einfachen Normierung wurde dieser Stromunterschied durch den Maximal-Strom (I_{stat}) der jeweiligen Messung dividiert ($\Delta I_{\text{normiert}} = \Delta I / I_{\text{stat}}$).

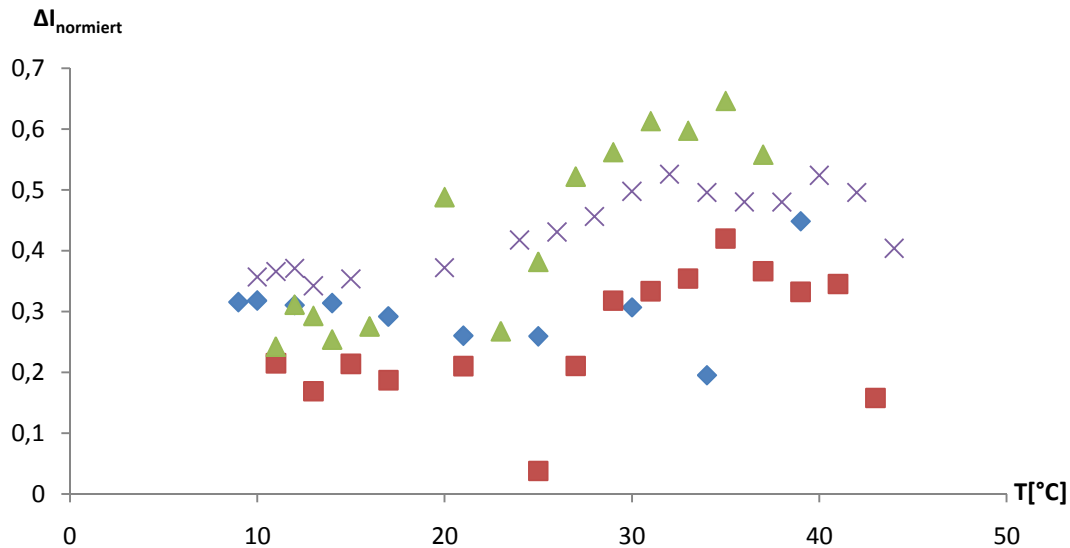


Abb.2.31: Abhängigkeit der Stromamplitude von der Temperatur bei Kcv-A17 transfizierten HEK293-Zellen

Dargestellt sind die normierten Stromamplituden von 4 verschiedenen Kcv-A17 transfizierten HEK293-Zellen in einem Temperaturbereich von 10-44°C bei einer Referenzspannung von -140 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung.

Bei Betrachtung von Abbildung 2.31 ist erkennbar, dass alle 4 Zellen einen ähnlichen Kurvenverlauf aufweisen, der lediglich entlang der y-Achse verschoben ist. So weist der Kurvenverlauf ein Maximum im Bereich von ca. 35-37°C auf. Erhöht man die Temperatur weiter, kommt es jedoch nicht, wie vielleicht erwartet, zu einem weiteren Anstieg, sondern zu einer Verringerung der Stromamplitude. Diese ungewöhnliche Temperaturabhängigkeit wurde auch schon von anderen in Experimenten mit Kcv beobachtet und beruht wahrscheinlich auf einer temperaturstimulierten Zunahme des schnellen *Gatings* (persönliche Kommunikation; SJ Tucker University of Oxford, UK).

2.3.2. Temperaturabhängigkeit von Kcv-wt

Die vorangegangenen Analysen der Kcv-A17-Mutante deuten darauf hin, dass das langsame *Gating* auf einem Prozess beruht, der möglicherweise beim Formieren und Aufbrechen von Salzbrücken beteiligt ist bzw. die Salzbrückendynamik moduliert. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Energiebarriere, die beim stochastischen Aufbrechen der Salzbrücke überwunden werden muss. Bei den funktionellen Alanin-Insertions-Mutanten scheint diese Energiebarriere soweit herabgesetzt zu sein, dass schon bei Raumtemperatur das langsame *Gating* in Form einer trägen Aktivierung bei negativen Spannungen sichtbar wird. Erhöht man die Temperatur wird diese träge Komponente beschleunigt bzw. verstärkt.

Da diese träge Aktivierung bei der Expression des Kcv-Wildtyps in HEK293-Zellen völlig fehlt, könnte man annehmen, dass die Energiebarriere im Wildtyp deutlich höher ist als in den funktionellen

Verlängerungsmutanten. Daher stellt sich die Frage, ob es möglich ist durch eine Erhöhung der Temperatur diese Energiebarriere zu überwinden und auch im Kcv-wt die träge Aktivierung wiederherzustellen. Zu diesem Zweck wurden auch für Kcv-wt temperaturabhängige Messungen gemacht, wobei die Temperatur ausgehend von Raumtemperatur ausschließlich erhöht wurde. In Abbildung 2.32 sind die Stromantworten einer Kcv-wt exprimierenden HEK293-Zelle bei 3 verschiedenen Temperaturen dargestellt.

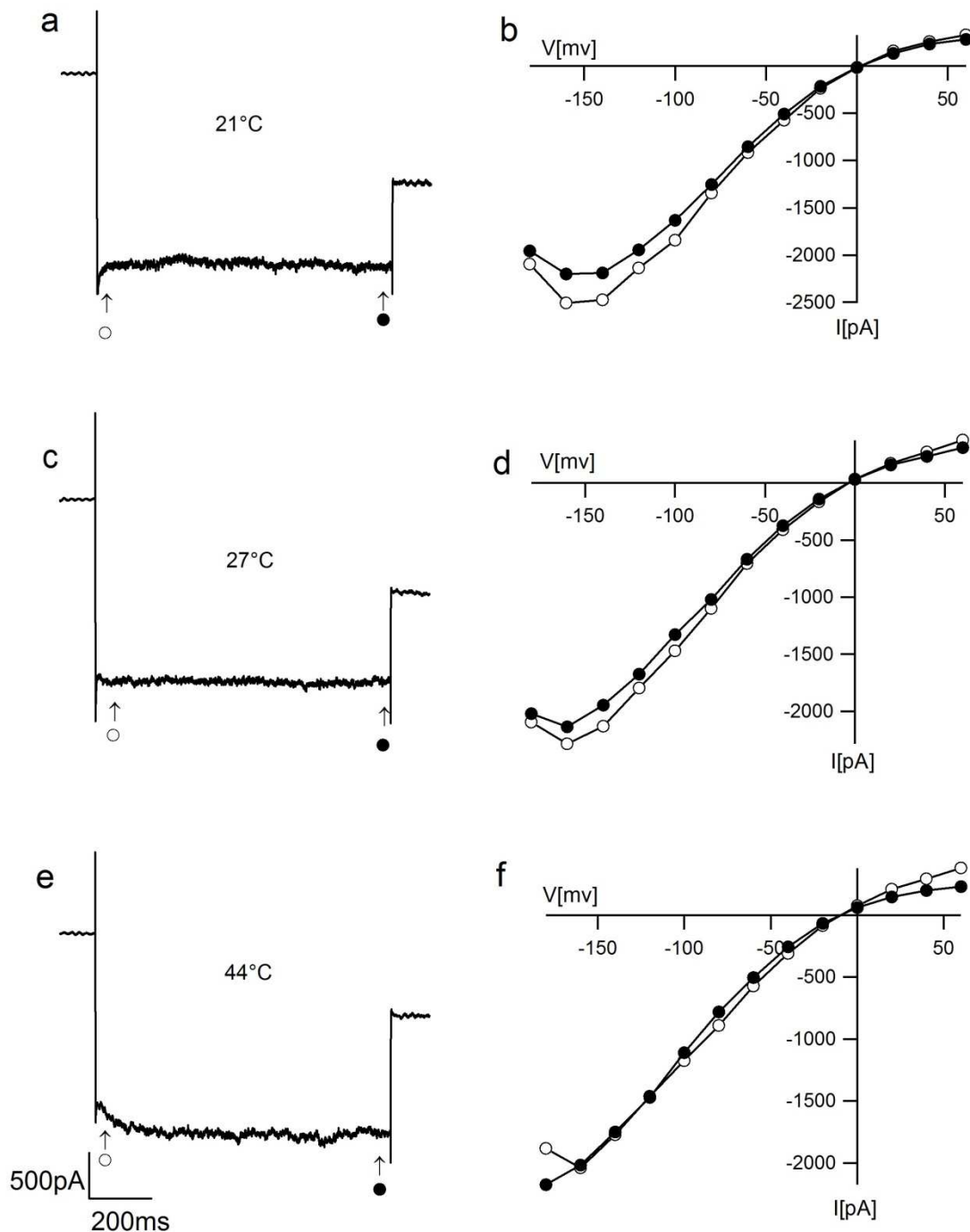


Abb.2.32: Kcv-wt bei verschiedenen Temperaturen

Stromantworten einer Kcv-wt-transfizierten HEK293-Zelle auf einen Spannungssprung von 0 mV auf -140 mV bei 21°C (a), bei 27°C (c) und bei 44 °C (e) in einer 100 mM KCl-Badlösung. In den jeweiligen Strom-Spannungskurven (b, d, f) sind der instantane (○) und der stationäre Strom (●) im Vergleich dargestellt.

Wie man schon in Abbildung 2.32 gut erkennen kann, hat sich die Annahme, dass sich durch eine Temperaturerhöhung die Energiebarriere überwinden und die träge Aktivierung wiederherstellen lässt, bestätigt. Dies wird auch durch eine Darstellung, in der die Stromantworten der 3 Temperaturen nach einem Spannungssprung auf -140 mV übereinander gelegt und auf den gleichen Ausgangswert normiert wurden, verdeutlicht (Abb.2.33).

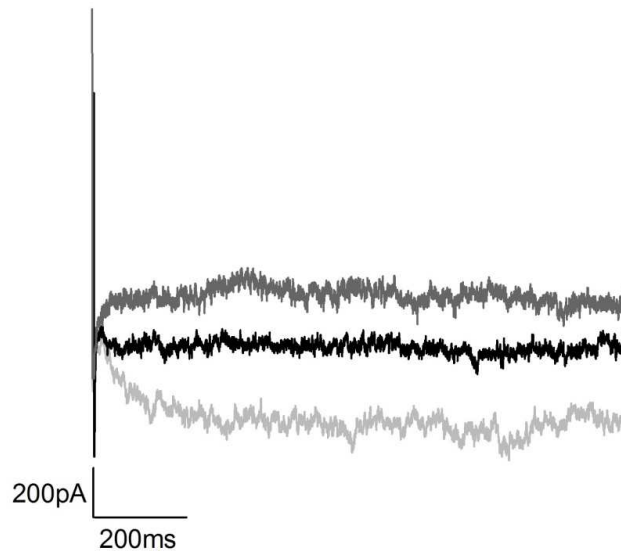


Abb.2.33: Unterschiede der Stromantworten einer Kcv-wt-transfizierten HEK293-Zelle bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt sind die Stromantworten einer Kcv-wt-transfizierten HEK293-Zelle auf eine Referenzspannung von -140 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung bei 3 verschiedenen Temperaturen. Dabei sind die Stromantworten auf einen gleichen Ausgangswert normiert.

Abbildung 2.34 zeigt, dass wie schon bei den Kcv-Verlängerungsmutanten (Abschnitt 2.3.1) auch bei der Aktivierung des Kcv-Wildtyps bei höheren Temperaturen der Verlauf der Aktivierung durch eine einfache Exponentialfunktion hinreichend beschrieben werden kann.

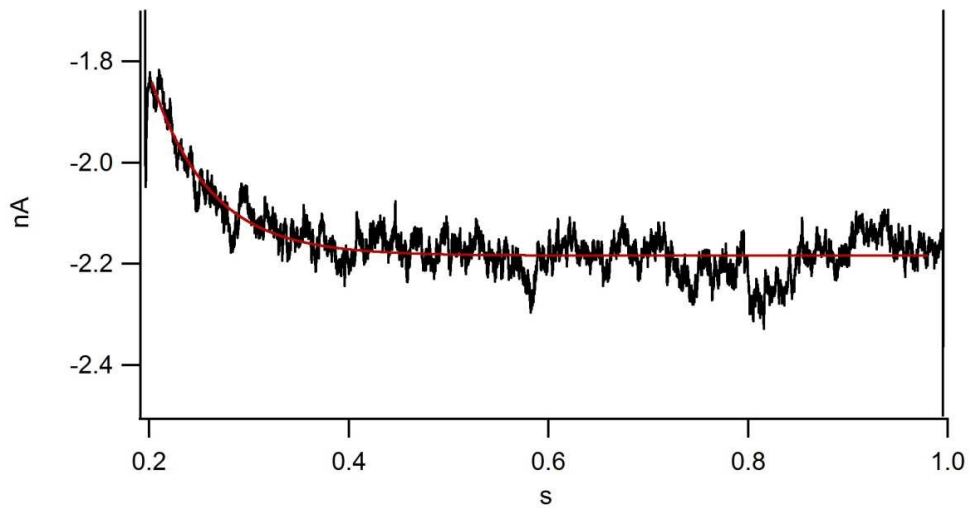


Abb.2.34: Aktivierung von Kcv-wt bei 44°C

Dargestellt ist die Stromantwort einer Kcv-wt-transfizierten HEK293-Zelle auf eine Referenzspannung von -140 mV bei einer Temperatur von 44°C. Die rote Kurve zeigt einen einfachen exponentiellen Fit (Gleichung 5). Der Fit erfolgt in einem Bereich von 1-98% der Zeit des Spannungspulses.

Bei einer Temperatur von 44°C ergibt sich für die Aktivierung von Kcv-Wildtyp eine Zeitkonstante (τ) von 59.33 ms. Trägt man diesen Wert in den Arrhenius-Plot der Kcv-A17-Mutante auf, zeigt sich, dass die Verlängerungsmutante eine Zeitkonstante (τ) von 60 ms schon bei deutlich niedrigeren Temperaturen erreicht (Abb. 2.35).

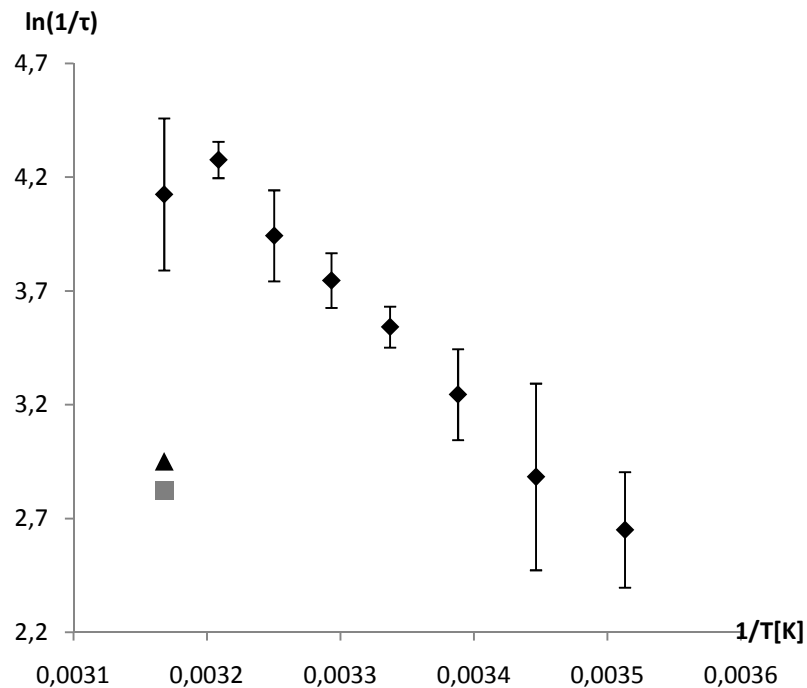


Abb.2.35: Arrhenius-Plot von Kcv-wt bei 44°C und der Mittelwerte der Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei verschiedenen Temperaturen

Dargestellt ist ein Arrhenius-Plot der Mittelwerte aller Zeitkonstanten von Kcv-A17-transfizierten HEK293-Zellen bei einer Referenzspannung von -140 mV in einer 100 mM KCl-Badlösung mit den entsprechenden Fehlerindikatoren. Das graue Quadrat stellt den ermittelten Wert für Kcv-wt bei 44°C dar. Das schwarze Dreieck stellt den ermittelten Wert bei 40°C von einer anderen Kcv-wt exprimierenden HEK293-Zelle dar.

Betrachtet man den Verlauf der Stromantworten von Kcv-wt exprimierenden HEK293-Zellen, fällt auf, dass erst bei sehr hohen Temperaturen von ca. 40°C die schnelle Inaktivierung von der langsamen Aktivierung deutlich sichtbar überlagert wird (Abb.2.32 und Abb.2.33). Allerdings erkennt man schon bei geringen Temperaturerhöhungen erste Veränderungen der Stromantworten, die sich in Form einer reduzierten Inaktivierung zeigen. In Abbildung 2.36 ist die zeitabhängige Änderung von Kcv-wt bei -140 mV als Funktion der Temperatur dargestellt.

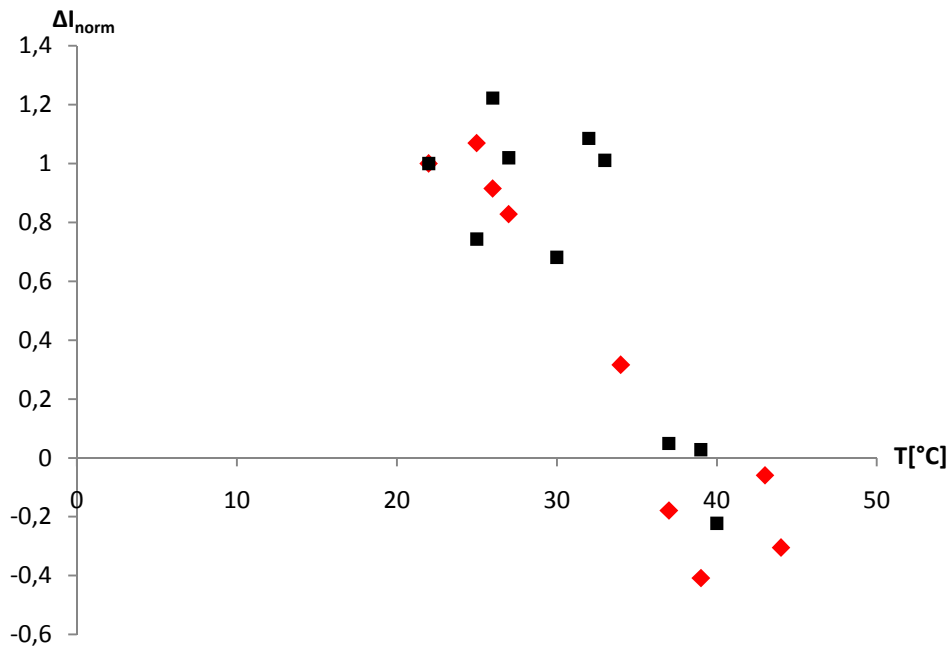


Abb.2.36: Zeitabhängige Änderung von Kcv-wt als Funktion der Temperatur

Aufgetragen ist die Stromdifferenz zwischen I_{stat} und I_{inst} der Stromantworten von Kcv-wt transfizierten HEK293-Zellen bei -140 mV. Die jeweiligen $\Delta I_{\text{stat}} - I_{\text{inst}}$ -Werte wurden dabei auf den Wert von Raumtemperatur (22°C) normiert.

Die Daten zeigen, dass auch bei Kcv-wt mit steigender Temperatur eine langsam aktivierende Stromkomponente erscheint. Allerdings benötigt man für eine aktivierende Komponente mit derselben Zeitkonstante bei Kcv-wt im Vergleich zu Kcv-A17 eine um ca. 25°C erhöhte Temperatur; dementsprechend weist Kcv-wt eine höhere Energiebarriere auf.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die träge Aktivierung auch in Kcv-wt wiederhergestellt werden kann. Um die erhöhte Energiebarriere überwinden zu können, ist eine Temperaturerhöhung notwendig. In den Verlängerungsmutanten ist diese Energiebarriere deutlich herabgesetzt, da schon bei Raumtemperatur eine ausgeprägte träge Aktivierung erkennbar ist. Grundlage der folgenden Diskussion wird demnach der Zusammenhang von der strukturellen Veränderung am cytoplasmatischen Ende der TM1 mit einer veränderten Energiebarriere und deren molekularen Grundlagen sein.

3. Diskussion – Teil1

Ionenkanäle fluktuieren stochastisch zwischen einem geschlossenen und einem offenen Zustand, ein Prozess der als *Gating* bezeichnet wird (Abschnitt 1.2.2.). Nur im geöffneten Zustand ist die Permeation von Ionen durch die Pore möglich. Demnach ist der Ionenfluss über einen Kanal ein hoch kontrollierter Prozess; viele physiologisch relevante Faktoren können das *Gating* von Ionenkanälen beeinflussen und binden den Stromfluss über die Kanäle auf diese Weise in zahlreiche physiologische Prozesse der Zelle ein. Diese Steuerung des *Gatings* erfolgt, indem die entsprechenden Faktoren die Wahrscheinlichkeit des offenen oder des geschlossenen Zustandes beeinflussen. Während die zeitliche Koordination des Ionenflusses über den *Gating*-Mechanismus kontrolliert wird, vermittelt die Filterregion die spezifische Selektivität für eine bestimmte Ionenart. Die Kontrolle der Aktivität eines Ionenkanals unterliegt daher dynamischen Strukturen, die unter bestimmten Bedingungen Konformationswechsel eingehen, was zum *Gating*, also zum Öffnen der Pore führt, und somit die Permeation von Ionen einleitet.

Auch der virale Kaliumkanal Kcv, der aufgrund seiner minimalen Größe von 94 Aminosäuren und seiner Architektur von TM1-P-TM2 das Kernmodul eines jeden Kaliumkanals darstellt (Abschnitt 1.3.2), zeigt diese Eigenschaften. Experimentell kann man bei Kcv jedoch mindestens zwei unterschiedliche Formen des *Gatings* unterscheiden:

- i: ein schnelles *Gating* in einem Zeitbereich von Mikrosekunden und
- ii: ein langsames *Gating* in einem Zeitbereich von Millisekunden (Abenavoli *et al.*, 2009).

Gegenwärtig geht man davon aus, dass das schnelle *Gating* auf eine Ionenverarmung im Selektivitätsfilter zurückzuführen ist. Ähnlich wie beim humanen MaxiK-Kanal kommt es beim Kcv-Kanal bei extremen positiven und negativen Spannungen zu einem ausgeprägten Flickern der Stromantwort in der Einzelkanalmessung. Dieses Flickern ist nicht durch die Inhibierung des K^+ -Stroms durch blockierende Ionen zu erklären. Vielmehr deuten die Daten darauf hin, dass in beiden Kanälen die gleichen Prozesse dem schnellen *Gating* zugrunde liegen. Schroeder & Hansen (2007) kamen zu der Annahme, dass beim MaxiK-Kanal bei extremen Spannungen die Ionen schneller aus dem Filter gezogen werden als sie aus dem Cytosol nachrücken können, was zu einer Ionenverarmung im Selektivitätsfilter führt. Infolgedessen kommt es zu einer gewissen Instabilität der Filterregion, was ein verstärktes Flickern des Stroms verursacht. Zudem wird die Hypothese, dass auch bei Kcv das schnelle *Gating* durch ein rasches Schalten in oder an der Filterregion vermittelt wird, auch durch neuere Daten unterstützt, bei denen eine Mutation in der Filterregion von Kcv dazu führt, dass die Einzelkanalleitfähigkeit bei negativen Spannungen keine negative Kennlinie und demnach kein schnelles *Gating* mehr aufweist (Tan *et al.*, 2010).

Das langsame *Gating* von Kcv, das zu einer trägen Aktivierung von Kanälen bei negativen Spannungen führt, wurde in der Vergangenheit mit einer Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit bei entsprechenden negativen Spannungen in Verbindung gebracht (Abenavoli *et al.*, 2009). Der molekulare Mechanismus, der dem langsamen *Gating* zugrunde liegt, war bisher jedoch nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen zum einen nahe, dass das schnelle und das langsame *Gating* zwei voneinander unabhängige Prozesse sind. Des Weiteren liefern sie erstmalig experimentelle Daten, die darauf hindeuten, dass das langsame *Gate* nicht im Filter des Kanals sondern an der Austrittsstelle der Cavität ins Cytosol lokalisiert ist und geben Aufschluss darüber welche molekularen Prozesse dem langsamen *Gating*-Mechanismus zugrunde liegen.

3.1 Schnelles und langsames *Gating* sind zwei unabhängige Prozesse

Die Tatsache, dass die beiden *Gating*-Prozesse in Kcv unabhängig voneinander sind, erkennt man darin, dass beide Formen des *Gatings* vorhanden sind, wenn das Kanalprotein in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird. Exprimiert man das Protein jedoch in HEK293 Zellen geht das langsame *Gating* verloren; wobei das schnelle *Gating* unverändert erhalten bleibt (Moroni *et al.*, 2002). Einen überzeugenderen Befund für die Unabhängigkeit beider *Gating*-Prozesse liefern die Beobachtungen aus dieser Arbeit. So kann auch das langsame *Gate* in HEK293-Zellen wieder aktiviert werden, ohne dass sich dabei die negative Kennlinie des instantanen Stroms, also das schnelle *Gating*, wesentlich verändert (Abb.2.15).

Somit ergibt sich für Kcv folgendes Bild hinsichtlich des *Gatings*: eine Population von Kanälen ist über den gesamten Spannungsbereich aktiv. Bei sehr negativen und positiven Spannungen kommt es zu einer spannungsabhängigen Aktivität des schnellen *Gates*. Beide Prozesse zusammengenommen erklären die Eigenschaften des Stroms von Kcv-wt so wie er in HEK293 Zellen registriert wird. Die Aktivierung des langsamen *Gates* durch die Insertion eines Alanins bzw. durch Erhöhung der Temperatur führt dagegen zu einer bi-phasischen Kinetik der Stromantwort. Konkret bedeutet letzteres für den Kcv-Kanal, dass (i) beide *Gates* nacheinander geschaltet sind. (ii) ist nur eines der beiden *Gates* geschlossen, kann kein Strom fließen. (iii) eine Population von Kanälen hat stets über den gesamten Spannungsbereich beide *Gates* geöffnet. (iv) durch die Mutation bzw. die Temperaturerhöhung ist diese Grundpopulation an offenen Kanälen zunächst kleiner. Erst bei negativen Spannungen wird die maximale Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wieder hergestellt. Die langsame Aktivierung ist demnach eine Freisetzung aus einem blockierten Zustand. (v) erst bei extremen Spannungen kommt darüberhinaus noch das schnelle *Gate* ins Spiel, das (bei geöffnetem langsamen *Gate*) aufgrund der Ionenverarmung im Filter zu flickern beginnt und so zur negativen Kennlinie führt. Die experimentellen Details, die diese Hypothese unterstützen, werden im Folgenden erörtert.

3.1.1. Der langsame *Gating*-Prozess kann in HEK293-Zellen reaktiviert werden

Die Reaktivierung des langsamen *Gates* in HEK293-Zellen beruht auf einer positionsabhängigen Verlängerung im N-terminalen Bereich der ersten Transmembrandomäne. Die mechanistische Ursache für die Reaktivierung des langsamen *Gates* infolge einer Alanin-Insertion kann demnach prinzipiell auf einer reinen Verlängerung der TM1 aber auch auf einer veränderten Orientierung bestimmter Aminosäuren zueinander beruhen.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Interaktion von integralen Membranproteinen mit den umgebenden Lipiden einen großen Einfluss auf die Stabilisierung eines Proteins und somit auf dessen Funktionalität hat (Yau *et al.*, 1998; Killian 2003; Domene *et al.*, 2003). Für Modell-Transmembranproteine wurde gezeigt, dass eine Übereinstimmung der hydrophoben Länge der Transmembrandomäne und der Membrandicke energetisch günstig ist. Dies verhindert ein sogenanntes hydrophobes *Mismatch* (Planque und Killian, 2003). Es wurde bereits gezeigt, dass solche Konformationsänderungen als Folge veränderter Protein-Membran-*Mismatches* die Aktivität von Transportproteinen beeinflussen können (Domene *et al.*, 2003, Dumas *et al.*, 1999). Die Insertion eines Alanins in die TM1 von Kcv könnte im Prinzip ein hydrophobes *Mismatch* auslösen, so dass die daraus resultierenden Kräfte zwischen den Lipiden der Membran und dem Protein die Funktion des Kanals beeinflussen. Die vorliegenden Daten sowie vorangegangene Studien und Simulationen sprechen jedoch gegen eine solche Hypothese (Hertel *et al.*, 2006; Tayefeh *et al.*, 2007). So konnte bereits in Simulationen gezeigt werden, dass die Insertion einer zusätzlichen Aminosäure in die TM1 zu keinem nennenswerten hydrophoben *Mismatch* in Kcv führt und keine sichtbaren konformationellen Änderungen induziert. Auch die experimentellen Daten dieser Arbeit bestätigen die Ergebnisse der Simulationen. Im Falle eines hydrophoben *Mismatches* müsste man annehmen, dass eine schlichte Verlängerung der TM1, egal an welcher Position, zu einer einheitlichen Funktionsveränderung führt. Die vorliegenden Experimente zeigen jedoch, dass die Reaktivierung des langsamen *Gates* im zweifachen Sinne positionsabhängig ist. Zum einen ist die Reaktivierung nur durch eine Verlängerung im N-terminalen Bereich der TM1 möglich, zum anderen zeigt sich auch innerhalb dieses Bereiches noch eine lokale Abhängigkeit von der Position, die sich in einer diskreten Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung niederschlägt.

3.1.2 Die Verlängerung der ersten Transmembrandomäne von Kcv induziert positionsabhängige Veränderungen

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die funktionellen Veränderungen, die durch eine Alanin-Insertion hervorgerufen werden, sehr stark positionsabhängig sind. Zum einen induziert die Insertion nur dann eine langsame Aktivierung der Stromantwort, wenn sie an der N-terminalen Seite der TM1 im Bereich von Kcv-A17-A14 erfolgt. Zum anderen ist auch

innerhalb dieses konkreten Bereiches eine darauf aufbauende lokale Positionsabhängigkeit erkennbar. Den letzteren Zusammenhang erkennt man an den unterschiedlichen Stromamplituden der jeweiligen Mutanten, wie auch an den unterschiedlichen $V_{1/2}$ -Werten für die Aktivierung des langsamen Stroms. Betrachtet man die durchschnittlichen Stromamplituden aller Kcv-Alanin-Insertionsmutanten fällt zunächst der abrupte Schnitt der Funktionalität zwischen Kcv-A17 und Kcv-A18 ins Auge (Abb.2.11). Es ist keinerlei Übergangsbereich von funktionell zu nicht funktionell zu erkennen. Dementsprechend kann die TM1 von Kcv an Position 17 in zwei funktionelle Abschnitte unterteilt werden. Nur bei einer Verlängerung im N-terminalen Bereich bleibt die Funktionalität erhalten und es kommt gleichzeitig zur Reaktivierung des langsamen *Gatings*. Alle Insertionen im Bereich von Position 18 bis Position 32 haben jedoch den kompletten Verlust der Leitfähigkeit von Kcv zur Folge. Dies bestätigt die oben schon erwähnte Annahme, dass als Ursache der induzierten Veränderungen kein hydrophobes Mismatch oder eine veränderte Neigung der TM1 infrage kommt. Vielmehr weist es auf eine funktionelle Zweiteilung der TM1 hin:

- i: Der kurze N-terminale Abschnitt im Bereich von Position 14-17 hat direkten Einfluss auf den Prozess des langsamen *Gatings* und
- ii: der restliche Abschnitt von Position 18-32 trägt zur Stabilisierung des Gesamtproteins in der Membran und des Selektivitätsfilters bei.

Demzufolge ist die TM1 von Kcv nicht als uniforme Helix zu betrachten, sondern eher als eine multifunktionelle Komponente, die in mehrfacher Art und Weise zur Funktionalität des Kanals beiträgt. Wie bei vielen viralen Proteinen ist auch bei Kcv die Kombination aus minimaler struktureller Komplexität mit maximaler Funktionalität zu beobachten. Aufgrund der minimalen Architektur eines jeden Monomers von TM1-P-TM2 kommen allen strukturellen Komponenten mehrere Funktionen zu. Dies trifft dementsprechend auch auf die TM1 zu. So interagiert diese sowohl mit den umgebenden Lipiden, als auch mit anderen Proteinabschnitten, wie Selektivitätsfilter oder Teilen der TM2 und erfüllt dabei essentielle Aufgaben für die Kanalfunktion.

Im Folgenden soll zunächst diskutiert werden, welche Funktion der C-terminale Abschnitt erfüllt, warum eine Verlängerung einen kompletten Funktionsverlust verursacht und wieso der Übergang von funktionell zu nicht funktionell so abrupt erfolgt.

3.1.3 Funktion des C-terminalen Abschnitts der TM1

Alle Kcv-Alanin-Insertions-Mutanten im Bereich von Position 32 bis Position 18 der TM1 verlieren, wie oben beschrieben, ihre Leitfähigkeit (Abb.2.10). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es durch die Insertion eines Alanins zu Verschiebungen innerhalb der Tertiär- bzw. Quartärstruktur kommt, die Auswirkungen auf wichtige funktionelle Bereiche, wie das *Gate* oder den Selektivitätsfilter haben können. Aufgrund der minimalen Architektur von Kcv ist anzunehmen, dass auch die Interaktion der verschiedenen Proteindömanen untereinander auf ein Maximum optimiert

ist. Daher reagieren neben dem Selektivitätsfilter auch andere Proteinabschnitte äußerst sensibel auf Mutationen; auch der C-terminale Abschnitt der TM1 erfüllt allem Anschein nach wichtige Aufgaben zur Funktionalität des Gesamtproteins. So könnte er für die Stabilisierung des Porenloops und des Selektivitätsfilters eine essentielle Rolle spielen. Auch für andere, teils deutlich komplexere, Kanalproteine konnten ähnliche Interaktionen von Transmembrandomänen mit dem Selektivitätsfilter nachgewiesen werden. So wird für die S6-Transmembrandomäne des Shaker-Kanals, die der TM2 von Kcv entspricht, eine direkte Interaktion mit dem Selektivitätsfilter gezeigt. Dabei führt eine Mutation einer einzelnen Aminosäure an Position 463 über eine direkte Interaktion mit dem Valin des Filters zu einer deutlich herabgesetzten Ionen-Affinität (Ogielska & Aldrich 1999). Dies zeigt, dass selbst größere Kanäle äußerst sensibel auf Mutationen in TM-Bereichen reagieren, die mit Abschnitten der Pore interagieren. Anhand der Kristall-Struktur des bakteriellen KcsA-Kanals konnte diese Interaktion bestätigt und modelliert werden. In einer anderen Arbeit werden weitere Brücken zwischen dem Selektivitätsfilter und den Helices von KcsA aufgezeigt (Blunck *et al.*, 2006). Hierüber wird auch eine Kopplung zwischen *Inner Gate* und Selektivitätsfilter diskutiert.

Dies zeigt, dass auch in anderen Ionenkanälen Mutationen der Helices im äußeren Bereich die Geometrie und damit die Funktion des Selektivitätsfilters stören. Da im Rahmen dieser Arbeit als Mutationen keine AS-Substitutionen, sondern Insertionen durchgeführt wurden, können die Auswirkungen dementsprechend größer ausfallen. So kann eine Insertion eine Verschiebung oder Drehung mehrerer benachbarter Aminosäuren induzieren und somit deutlich größere strukturelle Veränderungen hervorrufen. Der Funktionsverlust bei einer Insertion im C-terminalen Abschnitt der TM1 könnte somit Folge einer veränderten Interaktion mit dem Poren-Loop und einer verlorenen Geometrie bzw. Stabilität des Selektivitätsfilters sein.

Während die oben genannten Ausführungen aufzeigen warum Änderungen in der TM1 die Funktion eines Kanals nachhaltig korrumpieren können, stellt sich dennoch die Frage, warum der Übergang von funktionell zu nicht funktionell so abrupt eintritt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die kritische Position im Bereich von Kcv-A17 und Kcv-A18 lokalisiert ist. In der Sequenz von Kcv-wt findet man an diesen Positionen ein Histidin an Position 17 und ein Leucin an Position 18. Die Ergebnisse eines Hefe-Komplementationstests (siehe auch Abschnitt 4.2.2.4), bei dem ein Alanin-Scan der TM1 durchgeführt wurde, bestätigt, dass das Histidin an Position 17 für die Funktionalität des Kanals eine essentielle Rolle spielt (unveröffentlichte Daten; Manuela Gebhardt). Substituiert man das Histidin durch ein Alanin geht die Leitfähigkeit des Proteins völlig verloren und es ist nicht mehr in der Lage das Wachstum der Hefen unter selektiven Bedingungen zu komplementieren. Mit Hilfe des Homologiemodells von Kcv (Tayefeh *et al.*, 2009) zeigt sich, dass der Seitenrest dieser Aminosäure in die Membran gerichtet ist; er interagiert vermutlich mit den umgebenden Lipiden und verankert damit die TM1 im *Bilayer*. Das Histidin an Position 18 ist nur die erste Aminosäure der TM1 die für die Funktion essentiell ist. Auch bei weiteren C-terminal gelegenen Aminosäuren findet man, dass deren meist aromatische Seitenketten in die Membran weisen und so die TM1 in der Membran verankern. Die Tatsache, dass alle diese Aminosäuren essentiell für die Kanalfunktion sind, unterstreicht die Hypothese, dass eine korrekte Interaktion mit den Lipiden wichtig für die Funktionalität des Kanalproteins ist.

Die Sichtweise, dass der C-terminale Abschnitt der TM1 mit der Membran verankert ist, wird auch durch einen weiteren Befund aus den Simulationsanalysen bestätigt. Aus den Daten von Tayefeh et al. (2009) ergeben sich die B-Faktoren, die ein Maß für die Flexibilität darstellen, der C_{α} -Atome von Kcv-wt. Die Werte aus den letzten 4 ns des vollflexiblen Systems sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Betrachtet man die B-Faktoren der C_{α} -Atome, zeigt sich, dass die TM1 im C-terminalen Bereich ungefähr ab Aminosäure 19 sehr starr ist. Zum N-Terminus hin nehmen die B-Faktoren und damit die Flexibilität bzw. Mobilität der Proteindomäne stark zu. Die geringe Flexibilität des C-terminalen Abschnitts bestätigt die reduzierte Dynamik aufgrund der engen Interaktion mit der Membran auf der einen und dem Poren-Loop auf der anderen Seite.

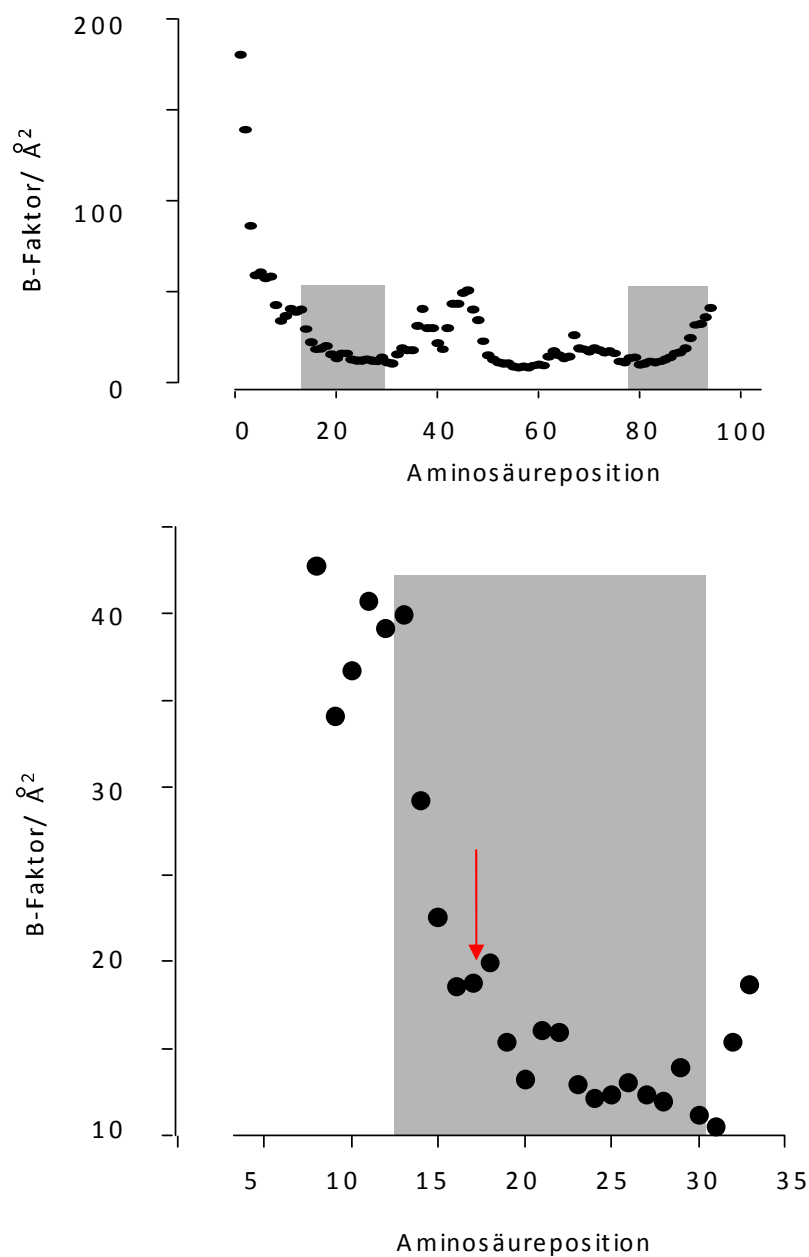


Abb. 3.1: B-Faktoren der c_{α} -Atome

In der Abbildung sind die B-Faktoren der C_{α} -Atome der jeweiligen Aminosäuren aufgetragen. Der rote Pfeil markiert das Histidin an Position 17 der TM1 von Kcv.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die TM1 eine ausgeprägte Zweiteilung in einen mobilen N-terminalen Bereich und in einen wenig mobilen C-terminalen Bereich aufweist. Die Arbeiten von Gebhardt (persönliche Kommunikation) zeigen, dass der C-terminale Bereich der TM1 durchaus Mutationen toleriert. Die Kanalaktivität geht jedoch verloren, sobald die Orientierung der TM1 und somit die Interaktion mit der Membran verändert wird. Das kann sowohl dadurch geschehen dass die membranverankernden Seitenketten mutiert werden oder ihre Ausrichtung zur Membran durch die Insertion eines Alanins verzerrt wird. Neben dem starren Teil hat die TM1 auch einen mobilen N-terminalen Abschnitt. Interessant ist, dass gerade dieser bewegliche Teil eine Alanin-Insertion toleriert und dass die Insertion darüber hinaus die *Gating*-Eigenschaften des Kanals verändern. Die möglichen Zusammenhänge zwischen Mobilität und *Gating* werden im folgenden Kapitel erörtert.

3.2 Salzbrücken bilden die molekulare Grundlage des langsamen *Gatings* von Kcv

Ein Modell für die Funktion des langsamen *Gates* muss folgende experimentellen Befunde berücksichtigen: Der *Gating*-Prozess ist mit der Struktur des beweglichen Abschnitts der TM1 korreliert. Ferner wird bei dem *Gating*-Prozess eine definierte, spannungssensible Energiebarriere überwunden. Zusammen mit früheren Befunden (Hertel *et al.*, 2009) und unter Berücksichtigung von Modellsimulationen ergibt sich daraus folgende Hypothese: der bewegliche N-terminale Abschnitt der ersten Transmembrandomäne ist Bestandteil des langsamen *Gates* von Kcv. Das *Gate* wird dabei durch Salzbrücken gebildet, die zwischen dem N-Terminus der TM1 und dem C-Terminus der TM2 ausgebildet werden (Abb.3.2). Die ausgebildeten Salzbrücken begünstigen den Zugang der Kaliumionen von Cavität zu Cytoplasma. Ein Öffnen und Schliessen des Kanals resultiert demzufolge aus einem konkurrierenden System von Ionen und Salzbrückenpartnern. Bilden beide Partner eine geschlossene Salzbrücke aus, ist der Kanal geöffnet und die Ionen können passieren. Ist die Salzbrücke dagegen geöffnet, werden die Ionen durch die freie Carboxylgruppe des C-Terminus abgefangen und lokal gebunden, so dass die Permeation unterbrochen und der Kanal dementsprechend geschlossen ist. In unserem Modell bilden die Salzbrücken demnach ein *Gate* das:

- i: das Öffnen und Schließen des langsamen *Gates* kontrolliert,
- ii: eine Spannungsabhängigkeit vermittelt und
- iii: im geöffneten Zustand die Durchflussrate der Ionen bestimmt.

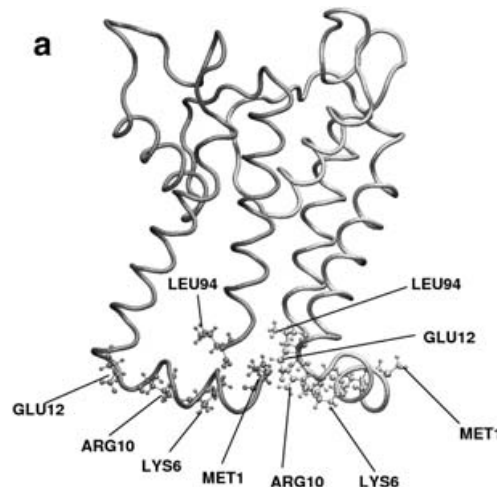


Abb. 3.2: Mögliche Salzbrücken am langsamen Gate von Kcv

In der Abbildung sind die möglichen Salzbrücken-Partner des N-terminalen und C-terminalen Bereichs von Kcv-wt dargestellt (Hertel *et al.*, 2009). Das Modell der Protein-Struktur wurde mittels MD-Simulationen erzeugt (Tayefeh *et al.*, 2009).

Dem Modell zufolge kommt es zu einem konkurrierenden System von sowohl Ionen, als auch positiven Ladungen des N-Terminus auf der einen Seite mit den negativen Ladungen der Carboxylgruppen des C-Terminus auf der anderen Seite. Die im Folgenden diskutierten experimentellen Ergebnisse liefern erstmalig konkrete energetische Werte und Zeitfenster und bestätigen darüber hinaus die Resultate vorangegangener MD-Simulationen.

3.1.1 Eine Verlängerung der TM1 von Kcv beeinflusst die Salzbrückenformierung, die das langsame Gate öffnet

Die träge Aktivierung des Stroms (Abb.2.13), wie sie durch das langsame *Gating* hervorgerufen wird konnte bisher nur bei Messungen von Kcv-wt in *Xenopus* Oozyten beobachtet werden (Plugge *et al.*, 2000). Die Reaktivierung der trägen Aktivierung in HEK293-Zellen durch Insertion eines Alanins in den mobilen Teil der TM1 verstärkt die Annahme, dass dieser Protein-Bereich Teil des langsamen Gates von Kcv ist. Nach Aufklärung der Kristallstruktur des bakteriellen KcsA-Kanals wurde das Haupt-Gate von Ionenkanälen im Bereich des „*Bundle Crossings*“ der Transmembrandomänen angesiedelt (Doyle *et al.*, 1998; Perozo *et al.*, 1998, 1999; Doyle, 2004). Ein Vergleich der Struktur des geschlossenen KcsA Kanals und des offenen MthK-Kanals deutet darauf hin, dass sich in diesem Bereich beim *Gating* größere konformationelle Änderungen ergeben. Sowohl beim pH-abhängigen *Gating* des KcsA-Kanals, als auch beim Ca^{2+} -aktivierten MthK-Kanal beruht der Konformationswechsel beim *Gating* auf einem konservierten Glycinrest, an der die innere Helix beim Öffnen abknickt und beim Schließen wieder gerade ausrichtet (Abb.1.5).

Auf den ersten Blick erscheint in einer Homologie-Modellierung von Kcv die zweite Transmembrandomäne, die keinen cytoplasmatischen Überhang aufweist, jedoch zu kurz um ein effektives „*Bundle Crossing*“ zu ermöglichen (Tayefeh *et al.*, 2009). In diesen MD-Simulationen wurde jedoch beobachtet, dass die negativ geladenen Carboxylenden des Kanals mit den positiven Kaliumionen interagieren und diese lokal binden können. Auf diese Weise erhöht sich die Ladungsdichte am Ausgang der Cavität und es kommt zu einer Art „Kalium-Block“ des Kaliumkanals. Der Permeationsweg kann erst wieder freigegeben werden, sobald es zu einer Salzbrückenformation zwischen den negativen Carboxylenden der inneren TM mit positiv geladenen AS-Resten des N-Terminus kommt. Durch die Bildung der Salzbrücke wird die Interaktion der Carboxylgruppe mit dem Kaliumion vermindert und das Ion kann transportiert werden. Die Relevanz dieses Prozess wurde bereits durch Studien bestätigt, bei denen putative Salzbrückenpartner eliminiert wurden, wodurch der Kanal inaktiv wurde (Hertel *et al.*, 2009). Die Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass die Alanin-Insertionen gerade in einem Bereich erfolgreich sind, der in der direkten Nähe zu den Salzbrückenpartnern liegt. Die Daten sind daher in Einklang mit der Hypothese, dass die Insertion eines Alanins die N-terminale Helix derart modifiziert, dass die Formation von Salzbrücken zwischen N-Terminus der TM1 und C-Terminus der TM2 beeinflusst wird, was die Kinetik des langsamen Gates verändert. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Salzbrücke bei geringen Spannungen aufgebrochen ist, wodurch ein vom C-Terminus „eingefangenes“ Kaliumion den Stromfluss blockiert. Erst nach einem Spannungssprung zu negativen Spannungen bildet sich mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eine Salzbrücke aus, so dass das Ion wieder freigelassen wird und der Stromfluss nicht weiter unterbrochen ist. Dies führt zu der langsamen Aktivierung des Stromflusses.

Die Tatsache, dass die Alanin-Insertionen in dem flexiblen Abschnitt der TM1 dazu führen, dass das langsame *Gate* reaktiviert wird, deutet darauf hin, dass das langsame *Gating* keine starre sondern eine dynamische Interaktion widerspiegelt. An dieser Stelle sollte auch erwähnt werden, dass ähnlich wie die TM1 auch die TM2 eine Zerteilung hinsichtlich ihrer Mobilität aufweist. Wie schon für die TM1 beschrieben ist auch bei der benachbarten TM2 der zum Cytoplasma orientierte Bereich deutlich flexibler (Abb.3.1). Daraus lässt sich ableiten, dass die cytoplasmatischen Bereiche beider Transmembrandomänen durch ihre Flexibilität zum einen die Möglichkeit haben in stochastischer Art und Weise Salzbrückenpartner zu finden und zum anderen auch wegen ihrer Flexibilität die lokale Verengung am Ausgang aus der Cavität aufzuweiten.

Für diese Hypothese spricht nicht nur die lokale Architektur im Protein, sondern auch die Energiebarrieren, die für die Aktivierung des langsamen *Gates* ermittelt wurden.

Durch Messungen zur Temperaturabhängigkeit des langsamen *Gatings* der Alanin-Insertionsmutanten ist man erstmalig in der Lage konkrete Werte der Aktivierungsenergie des zugrunde liegenden Prozesses zu erhalten. Die Messungen zeigen, dass die Energiebarriere für diesen Prozess in der Größenordnung von $45 \pm 2,5$ kJ/mol bei einer Spannung von -140 mV liegt. Dieser Energiebetrag liegt deutlich unter dem Wert, der für eine größere strukturelle Konformationsänderung notwendig wäre. Bei letzteren ist die Energiebarriere deutlich größer. Der Transport von Ionen oder hydrophilen Substanzen ist oft mit hohen Aktivierungsbarrieren

verbunden. So ist im Zuckertransporter SGLT1 die Bindung von Na^+ mit einer hohen Aktivierungsenergie von ca. 100 kJ/mol und daher einer Konformationsänderung verbunden (Hazama *et al.* 1997). Im Fall der Ca^{2+} -ATPase ist die Ca^{2+} -Translokationsreaktion mit einer hohen Energiebarriere von 80 kJ/mol verbunden (Peinelt and Apell 2004). Demzufolge ist eine größere molekulare Umlagerung im Kcv Protein, wie zum Beispiel eine Bewegung des gesamten Proteins im elektrischen Feld eher unwahrscheinlich. Der Wert für die Energiebarriere des langsamen *Gating*-Prozesses liegt jedoch in einem Größenordnungsbereich, der dem Aufbrechen von Salzbrücken in Proteinen entspricht. So konnte bereits für andere Proteine gezeigt werden, dass die benötigte Energie, die für das Aufbrechen von Salzbrücken innerhalb der Tertiär- und Quartär-Struktur von Proteinen bei ca. 30 kJ/mol liegt (Gruia *et al.*, 2004).

In Kombination mit den Simulationen aus der Arbeit von Tayefeh *et al.*, (2009) und den experimentellen Daten dieser Arbeit legen die gemessenen Energiebarrieren des langsamen *Gatings* also nahe, dass der Kanal leitet wenn eine Salzbrücke zwischen N-Terminus der TM1 und C-Terminus der TM2 ausgebildet ist. Eine bestimmte Population an Kanälen befindet sich stets in diesem Zustand, was den instantanen Strom erklärt, der beim wt-Kanal und bei den verlängerten Mutanten bei allen Spannungen fließt. Kommt es zu einem Aufbrechen von Salzbrücken wird die Ion-Proteininteraktion zusätzlich gefördert mit der Folge, dass die Wahrscheinlichkeit der Ionenleitung über das langsame *Gate* abnimmt.

Nach diesem Modell ist beim Kcv-wt Kanal eine maximale Offenwahrscheinlichkeit bei negativen Spannungen so schnell erreicht, dass der Strom keine nennenswerte träge Aktivierungskinetik aufweist. Die träge Kinetik bei den Mutanten kommt dadurch zustande dass die Bildung der Salzbrücken und damit das Öffnen des Kanals nur langsam eintritt.

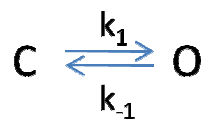
Die Hypothese, dass das Aufbrechen von Salzbrücken der ratenlimitierende Schritt beim langsamen Aktivieren des Kanals ist, wird durch mehrere Befunde untermauert:

Die Messungen von Kcv-wt bei erhöhter Temperatur, zeigen, dass die Zunahme an Temperatur vermehrt zu einer trägen Aktivierung führt. Wenn man bedenkt, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einer verkürzten Lebensdauer von Salzbrücken führt, kann man verstehen, dass bei hohen Temperaturen die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle reduziert ist, da weniger C-Termini durch Salzbrücken fixiert sind. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei einer Erhöhung der Temperatur im Wildtyp die Stromamplitude nicht wie erwartet steigt, sondern abnimmt (Abb.2.31). Dieser Befund kann jetzt damit erklärt werden, dass bei hohen Temperaturen mehr Salzbrücken aufgebrochen werden und damit mehr Kanäle geschlossen sind, was zu einem reduzierten instantanen Strom führt (Abb.2.32). Erst durch das Anlegen einer negativeren Spannung werden die freien C-Termini vermehrt zu ihren Salzbrückenpartnern getrieben wodurch die Kanäle eine maximale Offenwahrscheinlichkeit erreichen.

Die oben genannte These wird auch durch den Arrhenius-Plot der Kanalaktivierung, der mit einer einfachen Gerade beschrieben werden kann, unterstützt. Dieser Befund zeigt, dass für den zugrundeliegenden Prozess nur ein einziger Mechanismus ratenlimitierend ist.

Wie schon erwähnt liegt der Wert für die Energiebarriere des langsamen *Gating*-Prozesses in einem Größenordnungsbereich, der dem Aufbrechen von Salzbrücken in Proteinen entspricht (Gruia *et al.*, 2004). Ferner zeigt sich, dass auch die ermittelten Arrhenius-Vorfaktoren sehr gut zu einer Salzbrückendynamik passen. So liegt der Wert der Arrhenius-Vorfaktoren von beispielsweise -140 mV bei $2.37 \pm 2.42 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. Die Berechnung des Kehrwerts liefert die entsprechenden Zeitskalen für die Frequenz der Salzbrückenkinetik, die für -140 mV zwischen $0.4 \pm 0.4 \text{ ns}$ liegen. Dies entspricht auch dem Zeitfenster für die Lebensdauer von Salzbrücken an der entsprechenden Stelle in Kcv, wie sie aus vorangegangenen Simulationen ermittelt wurde (Tayefeh *et al.*, 2007). Sollten Salzbrücken in den langsamen *Gating*-Prozess involviert sein, deutet dies darauf hin, dass durch die Formation von Salzbrücken neben dem Öffnen und Schließen des Gates und der Spannungsabhängigkeit auch die Ionendurchflussrate im geöffneten Zustand reguliert wird.

Im Kontext dieser Hypothese müssen wir im Folgenden erörtern, wie das Aufbrechen einer Salzbrücke, also das Schließen des Kanals, mit der trägen Kinetik der Aktivierung kausal in Beziehung zu setzen ist. Zur Veranschaulichung lässt sich das oben Gesagte in einem einfachen *Gating*-Modell mit einem geschlossenen Zustand C und einem offenen Zustand O und den jeweiligen Übergangsraten k_1/k_{-1} beschreiben.



Dieses Modell lässt sich mit einer einfachen Differentialgleichung beschreiben (persönliche Kommunikation; Stefan Kast):

Gleichung (6): $P_O(t) = e^{-(k_1+k_{-1})t} (P_O(0)-P_O(\infty)) + P_O(\infty)$

und

Gleichung (7): $P_O(\infty) = k_1 / (k_1 + k_{-1})$

mit: P_O – Offenwahrscheinlichkeit; k_1 – Übergangsrate von geschlossen zu offen; k_{-1} – Übergangsrate von offen zu geschlossen; t – Zeit

Die Ratenkonstante k_1 ist spannungsabhängig; bei negativen Spannungen nimmt diese Ratenkonstante zu. Dadurch werden mehr Kanäle in den geöffneten Zustand (O) getrieben, so wie es im Experiment beobachtet wurde. Wir können ferner annehmen, dass k_{-1} die Ratenkonstante wiedergibt mit der die Salzbrücken aufgebrochen werden, wodurch sich der Kanal wieder in einen geschlossen Zustand begibt. Bei einer geringen Membranspannung ist $k_{-1} \gg k_1$. Nach einem Sprung

zu einer negativeren Testspannung, wie im Experiment, erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit weil k_1 zunimmt. Die träge Aktivierung, die im Experiment gemessen wird, ergibt sich aus dem Zusammenspiel von k_1 und k_{-1} . Wenn k_1 jedoch immer noch deutlich kleiner ist als k_{-1} , wird der zeitliche Verlauf der Kurve weiterhin vor allem durch k_{-1} , das heißt das Schließen der Kanäle dominiert. Aus dieser Logik folgt, dass daher das Aufbrechen von Salzbrücken und damit die Bereitstellung von Interaktionspartnern zwischen Kaliumion und Protein für den Prozess, der langsamen Aktivierung ratenlimitierend sein muss. Diese logischen Zusammenhänge passen zu den hier präsentierten Befunden, die besagen, dass die Energiebarriere für das Aufbrechen einer Salzbrücke limitierend für das langsame Öffnen von Kcv ist. Denn

Gleichung (8): $k_{\text{eff}} = k_1 + k_{-1}$

und

Gleichung (9): $\tau = 1 / k_{\text{eff}}$

mit: k_{eff} – ermittelte Übergangsrate; k_1 – Übergangsrate von geschlossenen zu offen; k_{-1} – Übergangsrate von offen zu geschlossen; τ – Zeitkonstante

Da sich aus der Arrhenius-Auftragung, wie oben bereits erwähnt, eindeutig ableiten lässt, dass dem Prozess nur ein Mechanismus zugrunde liegt, bestätigt sich auch experimentell, dass k_{eff} ungefähr k_{-1} entspricht, wenn $k_{-1} \gg k_1$.

Die experimentellen Daten zeigen, dass die Energiebarriere für das langsame *Gate* spannungsabhängig ist und dass die Barriere mit zunehmender Spannung ansteigt. So liegt die Aktivierungsenergie bei einer Spannung von -140 mV bei $45 \pm 2,5$ KJ/mol. Dagegen ist die Aktivierungsenergie bei einer Spannung von -120 mV mit $36 \pm 3,6$ KJ/mol signifikant kleiner. Auch dieser Befund passt in das gezeichnete Bild. Demnach wird es mit steigender Spannung immer schwieriger die Salzbrücken zu brechen und den Kanal zu schließen. Die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals nimmt, wie im Experiment zu sehen, mit zunehmender negativer Spannung zu.

In diesem Szenario müssen wir annehmen, dass die geschlossene Salzbrücke ein Spannungssensor sein kann. Diese Hypothese ist nicht unwahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass eine geschlossene Salzbrücke einen Dipol bildet. Wenn sich ein solcher Dipol in einem elektrischen Feld befindet, dann registriert dieser je nach Ausrichtung zu den Feldlinien und Dipolmoment die Feldstärke. Die Tatsache, dass sich die Salzbrücken von Kcv noch im Bereich der Membran befinden, ist im Einklang mit der Hypothese, dass die Salzbrücken als Spannungssensor in Kcv funktionieren können. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, dass die Verlängerung der TM1 je nach ihrer Position die Spannung, bei der der Kanal halbmaximal aktiviert ist, verschiebt. Dieser Befund unterstreicht die Möglichkeit, dass die Salzbrückendynamik selbst Teil des spannungsabhängigen Prozesses ist. Diese Hypothese, dass Salzbrücken eine Sensorfunktion für die

Membranspannung haben, muss sicherlich noch durch weitere Experimente überprüft werden. An dieser Stelle ist es jedoch wichtig festzuhalten, dass in dem kleinen Kcv-Protein nicht sehr viele andere geladene AS vorkommen, die als Spannungssensor fungieren könnten.

Die Beschreibung des langsamen *Gates* in Kcv liefert auch Implikationen für das Verständnis von spannungsabhängigem Schalten in anderen komplexeren Ionenkanälen. Rein phänomenologisch betrachtet hat die langsame Aktivierung der Kcv-A17-A14-Mutanten Ähnlichkeiten mit der Aktivierung von K^+ -Einwärtsgleichrichtern aus der Familie der *SHAKER*-Typ oder auch Kv genannten Kalium-Kanäle. Der pflanzliche Kalium-Kanal KAT1 zum Beispiel ist ein Kanal, der auf ganz ähnliche Weise bei negativen Spannungen langsam aktiviert. In vergleichenden Experimenten wurde im Laufe dieser Arbeit sogar eine ähnliche Temperaturabhängigkeit des langsamen *Gates* von KAT1 wie von Kcv gefunden. Anders als bei Kcv handelt es sich bei Kanälen wie KAT1 jedoch um Proteine mit 6 Transmembrandomänen; die TM4 dieser Kanäle trägt eine Reihe positiver Ladungen und wurde bereits in zahlreichen Studien als Spannungssensor dieser Kanäle identifiziert. Die Befunde dieser Arbeit besagen jedoch, dass die minimale Struktur von Kcv ausreicht um einen spannungsabhängigen Kanal zu generieren; der S4-Spannungssensor ist nicht unbedingt erforderlich. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Santos und Kollegen bei einem bakteriellen Kv Kanal das Porenmodul, also den Teil der äquivalent zu Kcv ist, vom Rest des Kanalproteins abtrennen und nachweisen konnten, dass auch dieser trunkierte Kanal im Experiment weiterhin eine Spannungsabhängigkeit aufweist (Santos *et al.*, 2008). Auch wenn diese Abhängigkeit ohne die Spannungssensordomäne (TM4) nicht mehr so steil ist wie im Wildtyp, ergibt sich daraus folgendes Bild: Das Porenmodul hat eine inhärente Spannungsabhängigkeit und diese Abhängigkeit könnte in allen Kanälen nach einem ähnlichen Prinzip wie bei Kcv funktionieren. Mit der Kopplung dieses *Gates* an die S4 Domäne wird die Regulation präziser und die Abhängigkeit von der Spannung verstärkt. Diese Hypothese, die eine Interaktion zwischen innerer und äußerer Transmembrandomäne im Porenmodul als wichtigen *Gating*-Mechanismus in Kalium-Kanälen per se identifiziert wird auch durch weitere Befunde von anderen Kanälen gestützt. Auch die pH-Abhängigkeit des KcsA-Kanals beruht auf einer Interaktion der inneren und äußeren Transmembrandomänen am Übergang zwischen Cavität und Cytosol. So wurde auch für KcsA in neueren Studien ein komplexes Netzwerk aus Salz- und Wasserstoffbrücken sowohl zwischen den Transmembrandomänen einer Untereinheit, als auch zwischen den einzelnen Untereinheiten beschrieben (Thompson *et al.*, 2008). In dem postulierten Modell liegt dieses Netzwerk im Bereich des „*Bundle Crossings*“ und ist somit Teil des *Gates*. Auch für Kaliumkanäle aus der Kir-Familie konnte gezeigt werden, dass das *Gating* durch Interaktionen zwischen TM1 und TM2 beeinflusst wird. In dem zugrundeliegenden Kir-Modell basiert diese Interaktion jedoch auf einer Wasserstoffbrücke, die pH-Sensitivität, pH- und PIP_2 -*Gating* und die Spannungsabhängigkeit kontrolliert (Rapedius *et al.*, 2007). Darüber hinaus wird auch für Kir-Kanäle, ähnlich wie im Fall von Kcv, über salzbrückenvermittelte Interaktionen zwischen den beiden Transmembrandomänen für *Gating*-Prozesse diskutiert. Es ist zu vermuten, dass das hier vorgestellte Kcv Modellsystem mit den detaillierten Einblicken in die Struktur/Funktionsbeziehungen zum molekularen Verständnis dieses Prozesses beitragen kann.

4 Einleitung Teil 2 – Duales *Targeting* / Hefekomplementation

4.1 Modelleigenschaften viraler Proteine

4.1.1 Aufklärung zellbiologischer Abläufe mit viralen Proteinen

Für ihre Replikation sind Viren fast vollständig auf die zelluläre Maschinerie ihres Wirtes angewiesen. Daher sind all ihre Proteine nach Jahrmillionen der Koevolution perfekt auf den jeweiligen Wirt abgestimmt. Dabei nutzen Viren die komplette zelluläre Infrastruktur ihrer Wirtszelle. Untersucht man die Interaktionen von Virus und Wirtszelle, kann man nicht nur die Physiologie des Virus aufklären, sondern ist auch in der Lage ungeklärte Abläufe innerhalb der Wirtszelle näher zu verstehen. Dies macht Viren zu idealen Werkzeugen der Zellbiologie. So nutzen Viren beispielsweise neben dem Transkriptions- und Translationsapparat auch die zelleigene Proteinsortierung. Auf diese fokussiert sich dieser Teil der Arbeit.

4.1.2 Der virale Kaliumkanal Kcsv

Wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit ersichtlich, können Viren nicht nur für zellbiologische Fragestellungen nützlich sein, sondern auch zur Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen Modellcharakter haben. Dies liegt an der Eigenschaft aller Viren, die Information für Proteine auf die kleinste katalytische Einheit zu reduzieren, um die Größe ihres Genoms so klein wie möglich zu halten. Auf diese Weise entstehen Proteine, die viele Elemente der Funktionalität weitaus komplexerer Proteine ihrer Proteinklasse aufweisen, strukturell jedoch auf eine Art Kernmodul reduziert sind. Dies trifft neben dem oben beschriebenen minimalen Kaliumkanal Kcv auch auf einen weiteren Kaliumkanal zu, den Kcsv-Kanal (Kaliumkanal *Ectocarpus siliculosus* Virus).

Der virale Kaliumkanal Kcsv stammt aus dem *Ectocarpus siliculosus* Virus (EsV-1). Dieser Virus infiziert, wie der Name schon sagt, die fädige Braunalge *Ectocarpus siliculosus*. Das Genom des EsV-1 ist vollständig sequenziert und mit 335 kb sehr groß. Es kodiert für insgesamt 231 Proteine, zu denen auch der Kcsv-Kanal zählt (Van Etten *et al.*, 2002). Kcsv weist eine hohe Homologie zu dem bereits beschriebenen Kcv-Kanal auf (Abschnitt 1.3). Sie unterscheiden sich hauptsächlich im 30 Aminosäuren längeren N-Terminus von Kcsv (Delaroque *et al.*, 2001, Balss *et al.*, 2008). In der Arbeit von Mehmel (2004) wurde der Kcsv-Kanal erstmals näher charakterisiert. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Pore von Kcsv durchaus in der Lage ist einen Kalium-selektiven Kanal auszubilden. Allerdings konnte das Wildtyp-Protein zunächst nicht elektrophysiologisch untersucht werden, da der Kanal in heterologen Expressionssystemen nicht an die Plasmamembran transportiert wurde. Mit Teilergebnissen aus diesem Teil der Arbeit ist es Balss *et al.* (2008) gelungen, zu zeigen,

dass Kesv, trotz der hohen Homologie zu Kcv, in die Mitochondrienmembran und nicht zur Plasmamembran transportiert wird.

4.1.3 Intrazelluläre Sortierung von Proteinen

Der intrazelluläre Transport von Proteinen (*targeting*) ist für das Überleben einer jeden Zelle essentiell. Dabei müssen die Proteine nach ihrer Translation an den Ribosomen zu vielen verschiedenen Orten innerhalb der Zelle zielgerichtet transportiert werden. Nur durch die Aufrechterhaltung einer bestimmten Proteinausstattung kann ein Organell oder eine Membran die jeweilige spezifische Funktion ausüben. Daher enthalten viele Proteine bestimmte Aminosäureabfolgen, sogenannte Signalsequenzen, die einen zielgerichteten Transport ermöglichen (Alberts *et al.*, 2002). Das sogenannte „*duale targeting*“ bildet dabei allerdings eine Ausnahme. Wie der Name schon sagt, wird beim *dualen targeting* das gleiche Protein an verschiedene Ziele innerhalb der Zelle transportiert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist daher weitaus komplexer und erst anhand weniger Beispiele beschrieben. Ein Beispiel für die Prinzipien des *dualen targetings* ist der virale Kaliumkanal Kesv.

4.1.4 Duales Targeting von Kcv und Kesv

Bei den Proteinen Kcv und Kesv handelt es sich um virale Kaliumkanal-Proteine. In beiden Fällen konnte die Funktionalität bereits nachgewiesen werden (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002; Gazzarrini *et al.*, 2003; Hertel *et al.* 2006; Mehmel, 2004, Balss *et al.*, 2008). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen beider Kanäle, so wird offenkundig, dass sich die Kanäle nicht nur funktionell, sondern auch sequenziell sehr ähnlich sind: Sie bestehen zu 26 % aus identischen und zu 51 % aus homologen Aminosäuren (Abb.4.1).

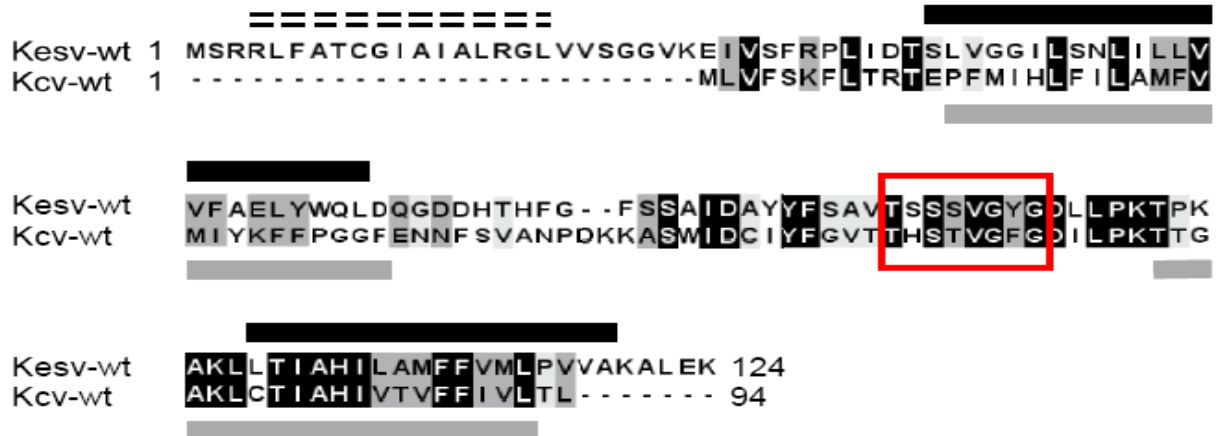


Abb.4.1: Alignment von Kcv und Kesv

In dem Alignment sind identische Aminosäuren schwarz und homologe Aminosäuren je nach Grad der Homologie dunkelgrau (hohe Ähnlichkeit bis hellgrau (geringe Ähnlichkeit) dargestellt. Die Transmembrandomänen von Kesv sind mit schwarzen und die von Kcv mit grauen Balken gekennzeichnet. Der doppelt gestrichelte Bereich markiert einen α -helikalen Bereich im N-Terminus von Kesv. Die *signature sequence* ist durch einen roten Kasten hervorgehoben (Balss 2007, Dissertation).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass beide Kanäle auch strukturell sehr ähnlich sind. So zeigen beispielsweise Hydrophobizitätsplots, dass auch die Transmembrandomänen beider Proteine gleich angeordnet sind.

Trotz der hohen Homologie beider Proteine werden sie, wie oben beschrieben, zu verschiedenen Zielen innerhalb der Zelle transportiert. Balss *et al.*, (2008) konnten zeigen, dass das *duale targeting* nicht allein auf den verlängerten N-Terminus zurückzuführen ist, sondern einem weitaus komplexeren Mechanismus zugrunde liegt. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Verlängerung der zweiten Transmembrandomäne an Position 113 von Kesv durch die Insertion von 3 Valinen (Kesv113VVV) das *targeting* redirektioniert, so dass der Kanal nicht weiter in die Mitochondrien gelangt, sondern, wie Kcv, die Plasmamembran zum Ziel hat (Abb.4.2).

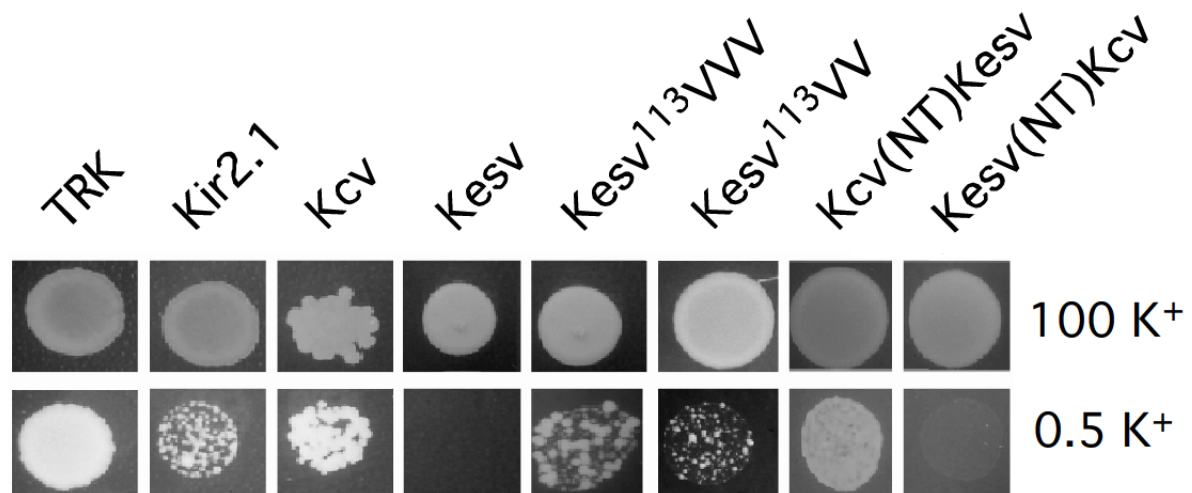


Abb.4.2: Hefe-Komplementationstest

Dargestellt ist ein Hefekomplementationstest mit verschiedenen Kaliumkanälen und Kcsv-Mutanten (das Prinzip des Komplementationstests wird weiter unten vorgestellt). Die obere Reihe der Bilder zeigt das Wachstum auf Agarplatten mit 100 mM Kalium. Die untere Reihe der Bilder zeigt das Wachstum auf Selektionsplatten mit 0,5 mM Kalium (Balss *et al.*, 2008).

Dabei zeigt der Komplementationstest aus Abbildung 4.2, dass den *trk1Δtrk2Δ*-Doppeldeletionsmutanten durch die Kalium-Kanäle bzw. Kalium-Transporter TRK, Kir2.1 oder Kcv das Wachstum auf Kaliummangelmedium ermöglicht wird. Kcsv ist dagegen nicht zur Komplementation in der Lage. Erst durch eine Insertion von 2 bzw. 3 Valinen in der TM2 an Position 113 (Kcsv113VVV; Kcsv113VV) kommt Kcsv an die Plasmamembran und ermöglicht den mutierten Hefen das Wachstum. Daraus konnte geschlossen werden, dass es eine Art Signalthierarchie gibt und dass das dominante Signal aus einem dreidimensionalen Motiv gebildet wird, welches für das mitochondriale *targeting* verantwortlich ist. Bereits kleine strukturelle Veränderungen, wie die Verlängerung an Position 113, können demnach bewirken, dass das *targeting* von Kcsv redirektioniert wird und von einer mitochondrialen Verteilung zu einer Sortierung in den sekretorischen Weg wechselt.

4.2 Hefekomplementation

4.2.1 Heterologe Expression von Kanalproteinen

Ein entscheidender Vorteil bei der Arbeit mit den viralen Kaliumkanälen ist, dass sie sich im Gegensatz zu bakteriellen Kanälen leicht in heterologen Systemen, wie zum Beispiel in HEK293-Zellen exprimieren lassen (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002; Gazzarrini *et al.*, 2003; Hertel *et al.* 2006; Balss *et al.*; 2008). Dies bietet in der Regel die Möglichkeit die Kanäle und ihre Mutanten elektrophysiologisch zu untersuchen. So kann man beispielsweise HEK293-Zellen mit beliebigen Kcv-Mutanten transfizieren und anschließend mittels der *Patch-Clamp*-Technik in der *Whole-Cell*-

Konfiguration charakterisieren. Um die transformierten Zellen leichter identifizieren zu können, kann ein Fusionsprotein aus dem Kanal und GFP hergestellt werden.

Dieses System arbeitet bei funktionellen Kanälen bzw. Kanalmutanten recht zuverlässig, da aufgrund der geringen endogenen Ströme der HEK293-Zellen Veränderungen in der Stromkinetik oder Stromgröße detektiert werden können (Abb.2.1). Führt eine spezifische Mutation eines Kaliumkanals jedoch zu einem Verlust der Leitfähigkeit, kann dies durch dieses System nicht eindeutig nachgewiesen werden. Schließlich kann man nicht ausschließen, dass der Verlust der Leitfähigkeit auf eine fehlende Lokalisation des Kanals an der Plasmamembran zurückzuführen ist oder dass das mutierte Protein gar nicht mehr in die Membran integriert wird. Desweiteren könnte der Strom einer Kanalmutante mit sehr stark reduzierter Leitfähigkeit von den endogenen Einwärtsströmen der HEK293-Zellen überlagert werden. Auch mit optischen Methoden wie der Confokalen Lasermikroskopie ist es derzeit nicht möglich die genaue Lokalisation von Fusionsproteinen aus einem viralen Kanalprotein und GFP zu bestimmen.

4.2.2 Die Methode der Hefekomplementation

Eine alternative Methode um die Funktionalität von Kaliumkanälen und deren Mutanten nachzuweisen ist der Hefe-Komplementationstest.

4.2.2.1 Die Hefe

Die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, ist ein einzelliger Pilz aus der Abteilung der *Eumycota*, Unterabteilung der *Ascomyceten*, Klasse der *Hemiascomyceten*, Ordnung der *Endomycetales* und Familie der *Saccharomycetaceae*. In der Industrie findet sie Anwendung in der Herstellung von zum Beispiel Bier oder Brot. Hefen sind heterotrophe, fakultativ anaerobe Mikroorganismen, die sich u.a. durch Sprossung vegetativer Zellen vermehren können (Abb.4.3).

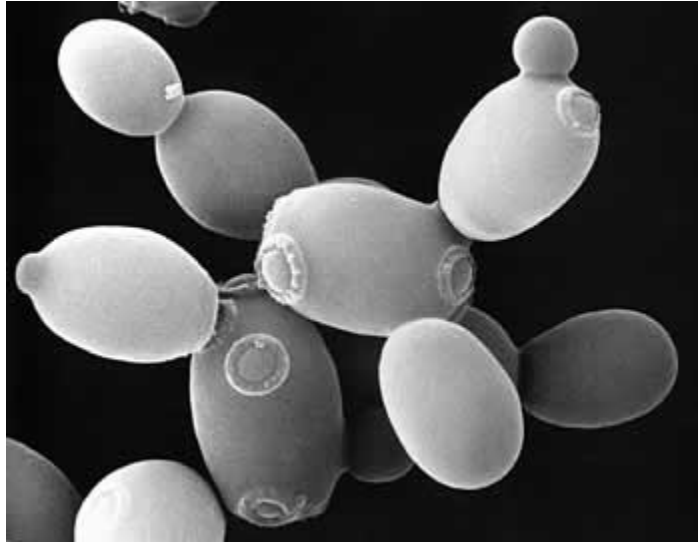


Abb. 4.3: Knospung von *S. cerevisiae*

Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines Hefe-Clusters (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried)

Die Bäckerhefe war der erste eukaryotische Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Goffeau *et al.*, 1996). Seitdem findet sie in der zell- und molekularbiologischen Forschung immer häufiger Anwendung und hat sich als eukaryotischer Modellorganismus etabliert. Das Genom umfasst ca. $1,2 \times 10^7$ Basenpaare, die sich auf 16 Chromosomen verteilen und ungefähr 6000 proteincodierende Gene enthalten. Da es sich bei *S. cerevisiae* um einen eukaryotischen Organismus handelt, können viele posttranslationale Prozesse, die für die Funktion vieler eukaryotischer Proteine notwendig sind, wie z.B. Disulfid-Brückenbildung, Signalpeptid-Erkennung oder N- bzw. O-Glykosylierungen, durchgeführt werden. Hefen können sowohl in haploider, als auch in diploider Form existieren und sich vermehren. Das Arbeiten mit haploiden Hefen ermöglicht es, schnell Mutanten herzustellen und deren Phänotyp zu analysieren. Aufgrund der Möglichkeit, die Hefen relativ einfach genetisch zu manipulieren, wird sie auch zur Expression und Untersuchung von heterologen Genen und Proteinen verwendet.

4.2.2.2 Der Kaliumhaushalt der Hefen

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass in der Plasmamembran der Bäckerhefe verschiedene Kalium-Transportsysteme lokalisiert sind (Gaber *et al.*, 1988, Bihler *et al.*, 1998, Bertl *et al.*, 1993). So findet man in der Plasmamembran unter anderem die Ionen-Transporter Trk1p, Trk2p sowie die Ionen-Kanäle Nsc1p und Tok1p.

Trk1p und Trk2p sind Kalium-Transporter, die mit einer hohen bzw. moderaten Affinität die Aufnahme von Kaliumionen in die Hefe-Zelle regulieren. Das Trk1-Protein besteht aus 1235

Aminosäuren und hat eine Masse von 141 kDa. Innerhalb dieses Proteins befinden sich 12 hydrophobe Segmente, die potentielle Transmembrandomänen darstellen, und eine mutmaßliche Nukleotidbindestelle (Gaber et al., 1988). Aufgrund der hohen Transportrate von Trk1p wird ein Symportmechanismus mit H^+ -Ionen diskutiert (Rodriguez-Navarro, 2000).

Der Kalium-Transporter Trk2p weist mit einer zu 55% identischen Sequenz eine hohe Homologie zu Trk1p auf. Allerdings erfolgt die Kaliumaufnahme in die Hefezelle mit einer deutlich geringeren Affinität als bei Trk1p.

Beide Transporter vermitteln einen Cotransport von entweder zwei K^+ -Ionen oder einem K^+ -Ion und einem anderen monovalenten Kation (H^+ , Na^+ , Cs^+ , und Rb^+), wobei die Bindungsaffinität für K^+ -Ionen am stärksten ausgeprägt ist (Haro and Rodriguez-Navarro, 2002). Trk2p wird im Gegensatz zu Trk1p nur schwach exprimiert (Ramos et al., 1994).

Deletiert man gezielt beide Kaliumtransporter erhält man einen Hefestamm, der nicht mehr in der Lage ist, in Medien mit geringer Kaliumkonzentration von beispielsweise 1mM KCl zu wachsen.

Ein weiterer Kanal in der Plasmamembran von Hefezellen ist der Nsc1p-Kanal (*Non-selective-cation-channel*). Wie der Name schon sagt, handelt es sich dabei um einen Kanal, der in der Lage ist, nichtselektiv die Aufnahme von Kationen zu ermöglichen. Die Gene, die für diesen Kanal codieren, und deren Loci sind bisher noch nicht identifiziert worden. Nsc1p kann durch eine Absenkung des pH-Wertes auf 3,5 oder durch eine millimolare Konzentration zweiwertiger Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} blockiert werden.

Im Gegensatz zu den Trk- und Nsc1p-Transport-Systemen handelt es sich bei dem Tok1p-Kanal (*Tandem Pore Outward Rectifying K^+ Channel1*) der Hefe um einen auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanal (Tab.1.1). Dieser weist eine Spannungsabhängigkeit auf und ist bei dem negativen Ruhepotential der Zellmembran in der Regel geschlossen und öffnet bei positiven Spannungen. Tok1p ist durch weitere verschiedene Faktoren modulierbar. So haben auch die extrazelluläre Kaliumkonzentration, die intrazelluläre Calciumkonzentration und der cytosolische pH einen Einfluss auf die Kanalaktivität. Die Funktion von Tok1p ist vermutlich die Turgorkontrolle und der Ladungsausgleich während der protonengekoppelten Molekülaufnahme. Eine Überexpression von Tok1p kann das Wachstum von Trk-Doppel-Deletions-Mutanten in Medien mit 1mM KCl teilweise wiederherstellen (Bertl et al., 1992, 1993, 1988).

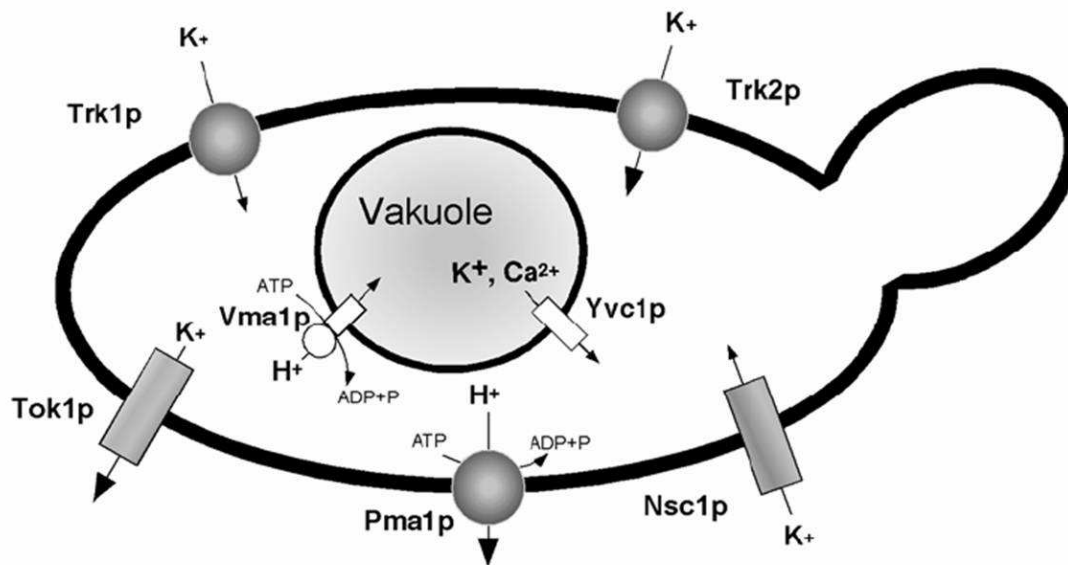


Abb. 4.4: Ionentransport in *S. cerevisiae*

Schematische Darstellung der am Kaliumtransport beteiligten Transportproteine in der Bäckerhefe (Eing 2006, Dissertation)

Die Aktivität der in Abb. 4.4 aufgeführten H^+ -ATPase Pma1p bewirkt eine Hyperpolarisation der Plasmamembran. Die dabei entstehende Membranspannung erreicht ein Niveau von bis zu -200 mV. Der Aufbau dieses Protonengradienten und des daraus resultierenden elektrischen Potentials der Plasmamembran ermöglicht es den Hefezellen, Kalium auch auf Kaliummangelmedien entgegen des bestehenden Konzentrationsgefälles aufzunehmen und in hohen Konzentrationen zu akkumulieren. Dementsprechend ist es den Hefezellen nur aufgrund dieser Aktivität von Pma1p möglich auch auf Kaliummangelmedien Kalium über die Trk-Influx-Systeme aufzunehmen und zu wachsen.

Das Zusammenspiel eines komplexen Systems bestehend aus den beiden Trk-Influx-Systemen, des Nsc1p und des Kalium-Effluxkanals Tok1p könnte einen Kontrollmechanismus für den intrazellulären pH und den Kaliumhaushalt darstellen (Rodriguez-Navarro 2000).

4.2.2.3 Wachstum der Hefen bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen

Durch die hochaffinen bzw. mittelaaffinen Kaliumaufnahmesysteme der Trk-Transporter wird den Hefen ein Wachstum auch bei μM Kaliumkonzentrationen ermöglicht. Deletiert man jedoch die Gene TRK1 und TRK2 in einem Hefestamm, ist die *trk1Δtrk2Δ*-Doppeldeletionsmutante nicht mehr in der Lage selbst bei millimolaren Konzentrationen von Kalium zu wachsen. Eine Deletion des TOK1-Gens hat keinerlei Effekt auf diesen Phänotyp.

4.2.2.4 Hefe-Komplementationstest

Eine große Anzahl von Studien zeigt, dass die funktionelle Expression von sowohl pflanzlichen, als auch tierischen einwärtsgerichtenden Kaliumkanälen die Kaliumaufnahme in *trk1Δtrk2Δ*-Hefestämmen komplementieren kann (Zaks-Makhina et al., 2004; Schachtmann et al., 1992; Sentenac et al., 1992). Erst diese Komplementation der Kaliumaufnahme durch die heterologen Kaliumkanäle ermöglicht es Hefestämmen, deren Kaliumaufnahme gestört ist, auch in Medien mit geringen Kaliumkonzentrationen wachsen zu können. Demnach eignet sich diese Methode hervorragend um putative Kaliumkanäle oder Kaliumkanalmutanten auf ihre Funktionalität zu überprüfen.

4.3 Versuchsziel

Wie bereits beschrieben ist es derzeit nicht möglich die genaue Lokalisation von heterolog exprimierten Kaliumkanälen und deren Mutanten mittels Confokaler Lasermikroskopie oder einer anderen Methode innerhalb einer Zelle eindeutig zu bestimmen. Daher kann bei Mutanten, die bei elektrophysiologischen Messungen keinerlei Funktionalität aufweisen, auch nie ausgeschlossen werden, dass sie die Plasmamembran womöglich gar nicht erreichen. Daher sollte mit dem Hefe-Komplementationstest eine Methode etabliert werden, mit deren Hilfe es möglich ist, die Funktionalität von Kaliumkanalmutanten schnell und effektiv und vor allem unabhängig von optischen oder elektrophysiologischen Mess-Methoden nachzuweisen.

Aus diesem Grund wurden zunächst Komplementationstests mit Modell-Kalium-Kanälen wie Kir2.1, Kcv, KAT1 oder dem endogenen Trk-Transporter als Positivkontrolle durchgeführt und erfolgreich abgeschlossen. Weiter fand diese Methode bereits Anwendung im Rahmen der Arbeit von Balss et al. (2008) und konnte dort einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des *targetings* von Kcsb leisten (Balss et al., 2008).

Aufgrund des einfachen Prinzips der Komplementation eignet sich diese Methode sehr gut, um im großen Maßstab nach funktionellen Mutanten zu screenen. Daher soll in diesem Teil der Arbeit eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe eine Vielzahl von Mutanten hergestellt werden kann, die randomisierte Mutationen oder Insertionen enthalten. Dies soll anhand des viralen Kaliumkanals Kcsb getestet werden. Wie oben bereits erwähnt führt eine Verlängerung der TM2 an Position 113 durch die Insertion von 3 Valinen zu einem veränderten *Sorting* des Kanals und somit zu einem Transport zur Plasmamembran. Inwieweit diese Insertion sequenzspezifisch ist oder ob sie variabel in ihrer Länge ist, soll mit dieser neuen Methode überprüft werden. Ziel ist es eine Bibliothek von Mutanten zu erstellen, die zunächst im Komplementationstest auf ihre Funktionalität überprüft und abschließend sequenziert werden.

5 Ergebnisse & Diskussion – Teil 2

5.1 *Directed Evolution*

Die randomisierte Veränderung von ganzen Proteinen oder bestimmten Proteinabschnitten erfreut sich immer größerer Beliebtheit. Dieser Vorgang, der auch als „*Directed Evolution*“ bezeichnet wird, bietet für das Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehungen viele Vorteile (Minor *et al.*, 1999). Vor allem in der Biotechnologie findet die *Directed Evolution* eine rege Anwendung. Denn besonders die Medizin und die Pharmaindustrie haben ein großes Interesse die Wirkung bestimmter Proteine zu modifizieren und auch unter veränderten Bedingungen zu optimieren (Jäckel, 2008). Um randomisierte Veränderungen zu erzeugen, benötigt man Methoden, die in der DNA-Sequenz zufällige Mutationen einfügen. Zudem benötigt man jedoch auch ein geeignetes Test-System, mit dem es möglich ist eine große Anzahl randomisierter Mutanten zu screenen.

Für die randomisierte Mutation kompletter Gene bietet sich beispielsweise die „Error Prone PCR“ oder eine cancerogene Bestrahlung an. Die randomisierte Veränderung von spezifischen Proteinabschnitten gestaltet sich jedoch schwieriger und ist bisher mit hohen Kosten verbunden. Ein Beispiel einer solchen Methode ist die Herstellung einer Bibliothek randomisierter Oligonucleotide, die als Kassetten in das Zielgen kloniert werden (Minor *et al.*, 1999). Allerdings ist allein die Herstellung dieser Oligonucleotid-Bibliothek sehr kostenintensiv. Daher wird im Folgenden eine Methode vorgestellt, die mit minimalen Kosten eine ähnlich effektive Randomisierung ermöglicht. Zudem bietet diese Methode den großen Vorteil alle randomisierten Mutanten ohne aufwendige Zwischenschritte mit Hilfe des Hefekomplementationstests als Selektionsverfahren auf ihre Funktionalität zu überprüfen.

5.1.1 *Randomized site directed PCR*

Die in dieser Arbeit entwickelte *randomized site directed PCR* ist eine spezielle Form der *site directed PCR* basierend auf der *QuickChangeTM Site Directed Mutagenesis* (Stratagene). In Kombination mit der *PhusionTM Polymerase* (Finnzymes) erlaubt sie die effiziente Herstellung einer großen Bibliothek an randomisierten Mutanten. Von großer Bedeutung ist dabei das Design der *Primer*. Dabei trägt nur der *forward-Primer* die randomisierte Sequenz. Je nach Länge des jeweiligen Randomisierungsbereichs kann die Anzahl der randomisierten Nukleotide variieren. Der *reverse-Primer* wird so gewählt, dass er versetzt, aber nahtlos an den *forward-Primer* anschließend komplementär binden kann (Abb.5.1). Für die weitere Klonierung müssen beide Primer an den 5'-Enden phosphoryliert sein.

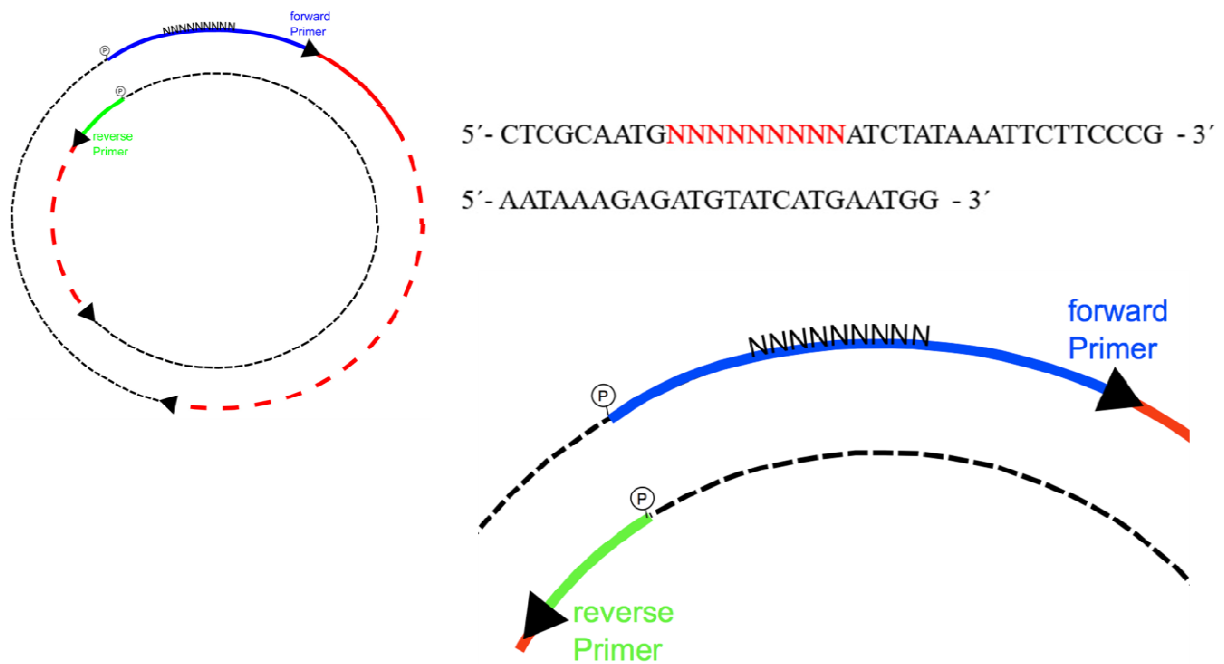


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der *randomized site directed PCR*

Der *forward-Primer* ist in blau dargestellt, wobei die randomisierten Nukleotide durch ein „N“ gekennzeichnet sind. Der *reverse-Primer* ist in grün dargestellt und enthält keine randomisierten Abschnitte. Das „P“ zeigt die 5'-Phosphorylierung beider Primer an.

Für die *randomized site directed PCR* wurde ein 50 µl Ansatz mit 0,3 ng *template*-DNA, 40 mmol dNTP-Mix (10 mmol je dNTP), je 150 ng eines *forward*- und eines *reverse-Primers*, 5 µl des 10x Reaktions-Puffers und 0,5 µl Phusion-DNA Polymerase eingesetzt. Für ein optimiertes PCR-Ergebnis empfiehlt sich die Durchführung nachfolgender Reaktionszyklen:

PCR-Programm:

	30 s 98 °C (Denaturierung der DNA)
18 Zyklen mit	8 s bei 98 °C (Denaturierung der DNA)
	20 s bei 55 °C (Hybridisierung der Primer)
	3 min bei 72 °C (Elongation durch die Polymerase)
	10 min 72 °C (Auffüllen unvollständiger Amplifikate)
	4 °C Stopp der Reaktion

Die großen Vorteile dieser neuen Methode sind:

- i: Es wird nur eine minimale Menge an *template*-DNA eingesetzt. Daher wird ein anschließender Dpn1-Verdau der *template*-DNA unnötig.
- ii: Durch die Wahl von versetzten *Primern* vermeidet man die Synthese von Hetero-Duplex-DNA. Hetero-Duplex-DNA würde z.B. in *E. coli* erkannt und abgebaut.

- iii: Die 5'-Phosphorylierung der *Primer* ermöglicht eine direkte Ligation der PCR-Produkte. Daher können alle randomisierten Konstrukte direkt in Hefen transformiert werden. Dies ist von besonderem Interesse, da auf diese Weise kein „Umweg“ über eine Transformation von *E. coli* mehr nötig ist. So bleibt die Randomisierungsrate einzig abhängig von der Menge an PCR-Produkten und wird nicht durch die Transformationsrate der *E.colis* limitiert.

Die Methode der *randomized site directed PCR* soll in diesem Teil der Arbeit zur Aufklärung des *dualen targetings* von Kcsb beitragen. Wie oben bereits erwähnt führt eine Verlängerung der TM2 an Position 113 durch die Insertion von 3 Valinen zu einem veränderten *Sorting* des Kanals und somit zu einem Transport zur Plasmamembran. Durch eine Randomisierung dieser 3 AS-Insertionen soll im Folgenden überprüft werden, inwieweit diese Veränderung sequenzspezifisch ist.

5.1.2 Transformation in Hefe und *Replica Plating*

Die randomisierten PCR-Produkte wurden zunächst aufgereinigt und ligiert und konnten im Anschluss direkt in kompetente Hefen transfiziert werden. Um eine möglichst große Anzahl an randomisierten Konstrukten zu testen, ist die Transformationsrate von entscheidender Bedeutung. Mit dem *Frozen-EZ Yeast Transformation II KitTM* (Zymo Research; Orange, USA) (siehe auch 7.5.5) wurden die besten Ergebnisse erzielt. Nach der Transformation wurden die Hefen zunächst auf SD(-ura)+A+100K⁺-Platten ausgestrichen. Auf diesen Platten können alle erfolgreich transformierten Hefen wachsen. Das Volumen der aufgetragenen Transformationsprobe wurde so optimiert, dass stets ein dichter Kolonierasen wächst, was eine hohe Screening-Quote an randomisierten Konstrukten pro Platte ermöglicht (Abb.5.2a).

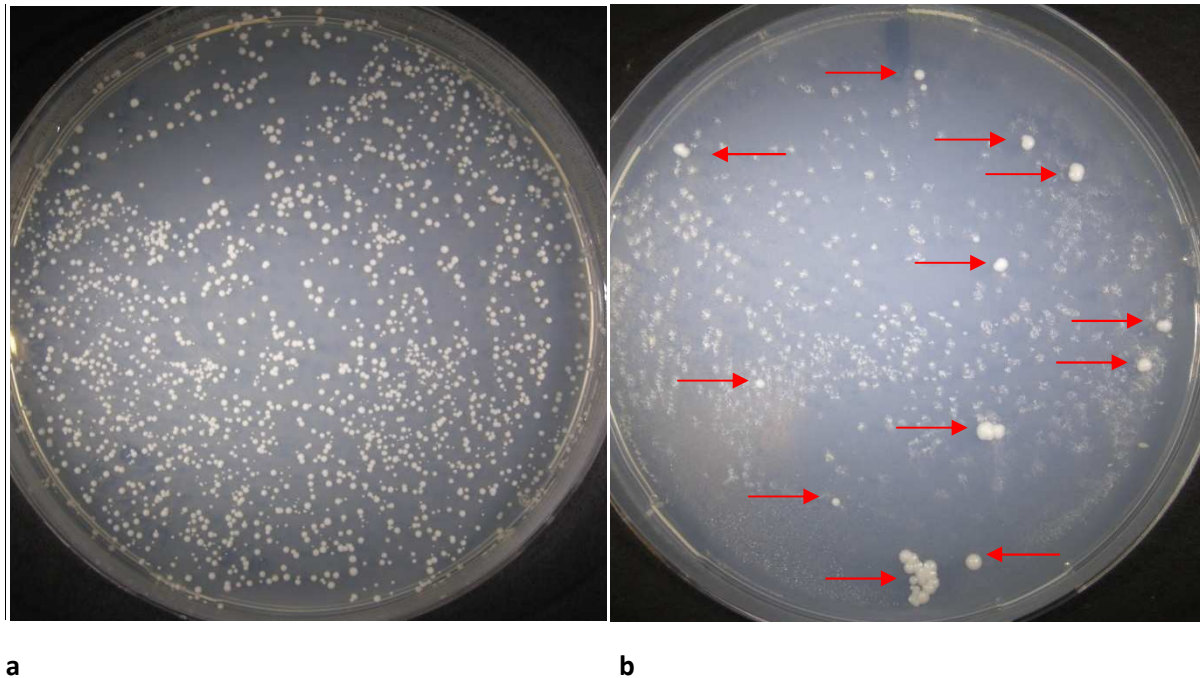


Abb. 5.2: Replica Plating

(a) Nach der Transformation wächst ein dichter Kolonierasen auf den SD(-ura)+A+100K⁺-Platten. Dabei stellt jede Kolonie einen randomisierten Transformanden dar. (b) Nach dem *Replica Plating* auf selektives Kaliummangelmedium sind nur die randomisierten Transformanden in der Lage zu wachsen, die einen funktionellen Kaliumkanal bilden, der an die Plasmamembran transportiert wird. Dabei sind die Hefekolonien, die ein Wachstum auf Kaliummangelmedium ermöglichen (rote Pfeile), deutlich von den abgestorbenen Hefen zu unterscheiden, deren randomisierte Konstrukte keine Komplementation ermöglichen.

Mit Hilfe des *Replica Platings* (siehe auch 7.5.7) ist es möglich alle Kolonien der SD(-ura)+A+100K⁺-Platte (Abb.5.2a) in einem einzigen Arbeitsschritt auf selektive Platten mit einem 1 mM Kaliummangelmedium zu übertragen. Auf diesen Platten ist es nur solchen Transformanden möglich zu wachsen, deren randomisiertes Kcsv-Konstrukt einen funktionellen Kaliumkanal bildet, der zur Plasmamembran transportiert wird. Diese Transformanden können die fehlende Kaliumaufnahme der *trk1Δtrk2Δ*-Doppeldeletionshefen komplementieren und bilden deutlich wachsende Kolonien. Alle anderen randomisierten Transformanden sterben unter diesen selektiven Bedingungen ab und sind durch die abgestorbenen Reste der durch das *Replica Plating* übertragenen Hefen erkennbar (Abb.5.2b).

Abbildung 5.2 zeigt, dass nur ein kleiner Anteil aller transformierten Hefen in der Lage ist auch auf Kaliummangelmedium zu wachsen. Während auf der SD(-ura)+A+100K⁺-Platte (Abb.5.2a) noch ein dichter Rasen an Kolonien vorhanden ist, weisen auf der selektiven Platte nur noch wenige Kolonien Wachstum auf. Anhand dieser Abbildung zeigt sich auch, dass die beiden großen Vorteile dieser neuen Technik sehr effektiv arbeiten: (i) die große Anzahl der Kolonien auf der SD(-ura)+A+100K⁺-Platte zeigt, dass sowohl die *randomized site directed* PCR als auch die direkte Transformation der ligierten PCR-Produkte in kompetente Hefen mit einer hohen Effizienz funktionieren. (ii) dass auch

die Kombination mit der Hefekomplementation als Selektionsverfahren sehr effektiv ist, da nach dem *Replica Plating* die Anzahl an komplementierenden Kolonien drastisch sinkt.

Für das *duale targeting* des viralen Kaliumkanals Ksv bedeuten diese Ergebnisse, dass aus der großen Menge von randomisierten Verlängerungsmutanten nur eine kleine Anzahl in der Lage ist, das Protein an die Plasmamembran zu redirektionieren und dort einen funktionellen Kaliumkanal auszubilden. Um nähere Aussagen über die positiven Verlängerungsmutanten treffen zu können, ist eine nachfolgende Sequenzierung nötig. Dazu werden die komplementierenden Hefekolonien von der selektiven Platte gepickt, mit Zymolyase verdaut (siehe auch 7.5.8), und nach einer Kolonie-PCR (siehe auch 7.2.1) zur Sequenzierung geschickt.

5.1.3 Sequenzanalyse

Konnte mit der Hefe-Kolonie-PCR eine ausreichende Menge an DNA-Produkt amplifiziert werden, wurden die Proben aufgereinigt und anschließend zur Sequenzierung geschickt. Die abschließende Sequenzanalyse liefert schließlich Aufschluss darüber, welche Ksv-113-NNN-Insertionsmutanten einen funktionellen Kanal bilden, der an die Plasmamembran transportiert wird. Zur Auswertung wurden nur Sequenzen herangezogen, die im Chromatogramm ein sauberes Signal ohne Doppelpeaks lieferten. Dazu wurde zunächst ein Alignment der jeweiligen Ksv-Mutante mit der Sequenz des Ksv-Wildtyps angefertigt (Abb.5.3).

```

                250      260      270      280      290      300
...GCGGTCACGTCTTCCTCTGTCTCGGATACGGCGATTTGTTGCCGAAAAC TCCGAAGGCAAAA
.....
...GCGGTCACGTCTTCCTCTGTCTCGGATACGGCGATTTGTTGCCGAAAAC TCCGAAGGCAAAA
                250      260      270      280      290      300

                310      320      330      340
170828 TTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTC-----GTGATGCTCCCC...
.....
_      TTGCTTACCATCGCACACATTTTGGCCATGTTCTTCAGCAAGGCAGTGATGCTCCCC...

```

Abb. 5.3: Sequenz-Alignment

Dargestellt ist ein Ausschnitt eines Sequenz-Alignments einer Ksv-113-Insertionsmutante (untere Sequenz) mit der Wildtyp-Sequenz von Ksv (obere Sequenz). Der grau hinterlegte Bereich zeigt die Insertion an, die eine funktionelle Ksv-Mutante zur Plasmamembran redirektioniert.

Es wurden insgesamt 13 verschiedene Ksv-Insertionsmutanten identifiziert, die in der Lage sind einen funktionellen Kanal auszubilden, der an der Plasmamembran der Hefen die Kaliumaufnahme komplementiert. In Abbildung 5.4 sind die entsprechenden Nukleotid- und AS-Sequenzen der Insertionen aufgeführt.

Nukleotid-Sequenz	Aminosäure-Sequenz
...ATGACGCTG...	MTL → Methionin, Threonin, Leucin
...AGCAAGGCA ...	SKA → Serin, Lysin, Alanin
...GGGATGCTC...	GML → Glycin, Methionin, Leucin
...TGGACGGTC...	WTV → Tryptophan, Threonin, Valin
...TTGATGCTA...	LML → Leucin, Methionin, Leucin
...GTAGGGGCG...	VGA → Valin, Glycin, Alanin
...CTGGAGGTA...	LEV → Leucin, Glutamat, Valin
...GTCTTCTAC...	VFY → Valin, Phenylalanin, Tyrosin
...GTGACGAAA...	VTK → Valin, Threonin, Lysin
...ACCAGCACA...	TST → Threonin, Serin, Threonin
...CTCGTCGCC...	LVA → Leucin, Valin, Alanin
...GCGACATTT...	ATF → Alanin, Threonin, Phenylalanin
...GTCTATGGG...	VYG → Valin, Tyrosin, Glycin

Abb. 5.4: Insertions-Sequenzen

Dargestellt sind die Sequenzen der Insertion an Position 113 von Kesv, die zu einer funktionellen Variante des Kanals mit einer Expression an der Plasmamembran der Hefen führen.

Betrachtet man die Auswahl an Aminosäuren, die bei den positiven Kesv-Insertionsmutanten auftritt, erkennt man, dass bestimmte Aminosäuren, wie z.B. Valin oder Leucin mit einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit auftreten als andere Aminosäuren. Auf der anderen Seite sind einige Aminosäuren wie beispielsweise Prolin, Arginin, oder Histidin in der Auswahl überhaupt nicht vertreten.

Abbildung 5.5 zeigt eine graphische Auswertung der Häufigkeit, mit der die einzelnen Aminosäuren bei den funktionellen Insertions-Mutanten vorkommen.

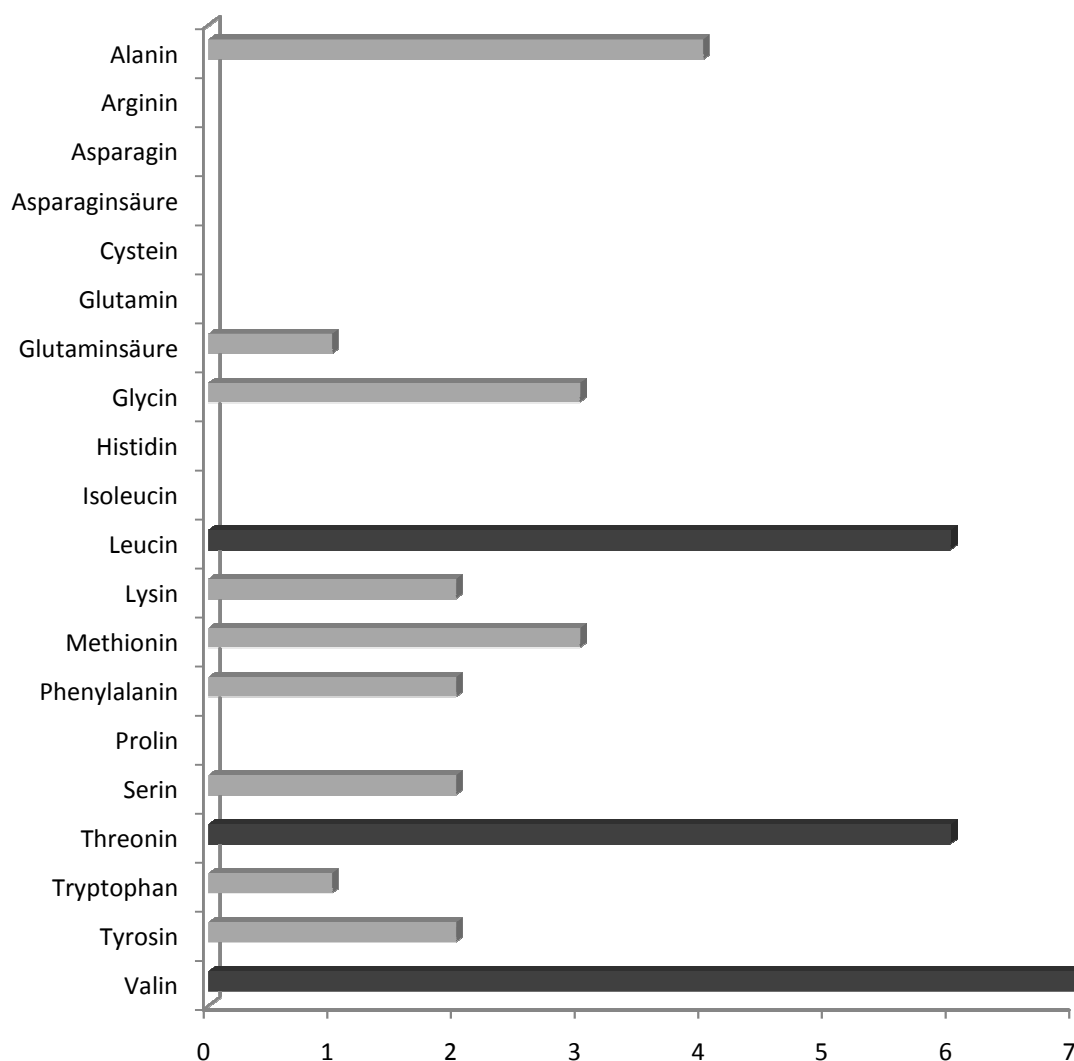


Abb. 5.5: Vorkommen der Aminosäuren

Dargestellt ist die Häufigkeit, mit der die jeweiligen Aminosäuren in die Sequenz von Ksv inseriert wurden.

Aus Abbildung 5.5 geht hervor, dass Valin die Aminosäure ist, die mit der größten Häufigkeit bei den positiven Insertionsmutanten von Ksv auftritt. Vor dem Hintergrund, dass die Ksv113VVV-Mutante (siehe auch 4.1.4) die Grundlage dieser Randomisierungsstudie bildet, ist dieses Ergebnis nicht weiter überraschend. Neben Valin treten aber beispielsweise auch Leucin oder Threonin häufig auf. Darüber hinaus werden allerdings auch weitere Aminosäure in dem Insertionsbereich toleriert. So treten auch Alanin, Glycin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Tryptophan oder Tyrosin auf. In Einzelfällen werden sogar geladene Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Lysin toleriert.

Analysiert man die Eigenschaften der auftretenden Aminosäuren, so fällt auf, dass ungeladene, unpolare und hydrophobe Aminosäure bevorzugt zu positiven Mutanten führen, wie man es auch für transmembrane Strukturen erwarten würde. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Befunden aus anderen Studien. So weisen beispielsweise die Aminosäuren Leucin, Valin, oder Threonin, die

hier mit der größten Häufigkeit inseriert wurden, auch in Studien zur Membraninkorporation von Proteinen eine hohe Einbauwahrscheinlichkeit auf (Hessa *et al.*, 2005). Aminosäuren wie Prolin, Arginin oder Histidin, die bei den Kesv-Insertionsmutanten völlig fehlen, werden dagegen nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit in die Membran inkorporiert. Auch die Studien zum Bestreben der einzelnen Aminosäuren zur Ausbildung einer α -Helix (O'Neil *et al.*, 1990) decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. So ist beispielsweise Prolin die Aminosäure mit der geringsten Tendenz eine Helix auszubilden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Stickstoffatom des Prolins in der Peptidgruppe nicht mit einem H-Atom verbunden ist und somit keine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden kann. Aufgrund des daraus resultierenden Knicks in der Sekundärstruktur gilt Prolin als „Helixbrecher“.

Auf der anderen Seite werden aber auch polare und teilweise auch geladene Aminosäure toleriert. So findet man beispielsweise Tyrosin als polare oder Glutaminsäure als geladene Aminosäure in den inserierten AS-Triplets.

In Bezug auf das *duale trafficking* von Kesv ergibt sich demnach folgendes Bild: (i) nur ein kleiner Anteil der randomisierten Konstrukte gelangt zur Plasmamembran und bildet dort einen funktionellen Kanal. (ii) Bestimmte Aminosäuren werden bevorzugt integriert, wobei nur wenige gar nicht toleriert werden. Diese Erkenntnisse untermauern die Hypothese, die in der Arbeit von Balss *et al.*, (2008) aufgestellt wurde und zeigen, dass eine Nettoverlängerung der TM2 Ursache des veränderten *targetings* von Kesv ist, die unabhängig von der Sequenz der inserierten Aminosäuren ist. Demzufolge führt die strukturelle Veränderung, die diese Verlängerung induziert zu einem *targeting*, das von einer mitochondrialen Verteilung in den sekretorischen Weg wechselt.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Struktur/Funktions-Beziehungen der zwei minimalen viralen Kaliumkanäle Kcv und Kesv untersucht.

Die elektrophysiologische Charakterisierung von Kcv-Mutanten, deren äußere Transmembrandomäne (TM1) um je ein Alanin verlängert wurde, konnte drei Beiträge zum Verständnis der Struktur/Funktions-Beziehung von Kcv leisten:

- (i) Schnelles und langsames *Gating* sind zwei voneinander unabhängige Prozesse.

Das langsame *Gating*, wie es zuvor nur in *Xenopus Oozyten* beobachtet wurde, kann auch in HEK293-Zellen wieder aktiviert werden, ohne dass dabei die negative Kennlinie des instantanen Stroms, die man auf ein schnelles *Gating* im Filter zurückführt, beeinflusst wird. Dies spricht dafür, dass beide Prozesse voneinander unabhängig sind.

- (ii) Die TM1 von Kcv weist eine funktionelle Gliederung auf.

Die TM1 von Kcv lässt sich in einen kleinen mobilen N-Terminalen Abschnitt und einen rigiden C-Terminalen Abschnitt gliedern. Während der starre C-terminale Abschnitt keine Alanin-Insertionen toleriert und wahrscheinlich essentielle Aufgaben für die Stabilisierung des Gesamtproteins in der Membran übernimmt, ist der mobile N-terminale Abschnitt direkt am langsamen *Gating* des Kanals beteiligt.

- (iii) Das langsame *Gating* basiert auf Salzbrückeninteraktionen zwischen dem C-Terminus der TM2 und dem N-Terminus der TM1

Mit Hilfe von temperaturabhängigen Messungen konnten erstmalig experimentelle Daten gewonnen werden, die nahe legen, dass Salzbrückeninteraktionen die molekulare Grundlage für das langsame *Gating* bilden. Die Energiebarriere, die beim *Gating* überwunden werden muss, liegt mit $45 \pm 2,5$ KJ/mol bei -140 mV auf einem Niveau, das dem Aufbrechen von Salzbrücken entspricht. Dies wird zudem durch den Befund bestärkt, dass die entsprechenden Mutationen im Bereich von möglichen Salzbrücken zwischen den Transmembrandomänen liegen. Ein *Gating*-Modell von Kcv über Salzbrücken basiert demzufolge darauf, dass der Kanal bei geschlossener Salzbrücke offen ist. Sobald die Salzbrücke aufbricht, werden Kaliumionen durch die nun freie Carboxylgruppe des C-Terminus abgefangen, so dass es zu einem „Kaliumblock“ für den Austritt von Kaliumionen aus der Cavität des Kaliumkanals kommt. Unserem Modell zufolge wird der Kanal spannungsabhängig geöffnet indem sich bei negativer Spannung mehr Salzbrücken bilden, die somit mehr Kanäle öffnen. Dies resultiert in einer langsamen Aktivierung des Stroms, wie es bei den Insertionsmutanten von Kcv beobachtet wurde.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Signale für eine intrazelluläre Sortierung des zweiten viralen Kaliumkanals Kcsv untersucht. Dazu wurde die Methode der *randomized site directed PCR* entwickelt. Diese Technik ist in Kombination mit der Hefekomplementation als Selektionsverfahren geeignet, um mittels *Directed Evolution* definierte Proteinabschnitte zu randomisieren, um so unvoreingenommen nach funktionellen Mutanten zu screenen. Es zeigte sich, dass eine Insertion von 3 Aminosäuren an Position 113 von Kcsv nur bei wenigen Konstrukten zu einer Redirektionierung des *targetings* von den Mitochondrien zur Plasmamembran führt. Die Analyse der positiven Mutanten ergab, dass der Sequenzbereich, der das *targeting* bestimmt weitgehend sequenzunspezifisch ist; das veränderte *targeting* basiert vor allem auf einer strukturellen Verlängerung der äußeren Transmembrandomäne. Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse, dass die neu entwickelte Randomisierungsmethode gut geeignet ist um unvoreingenommene, willkürliche Mutationen in definierte Proteinabschnitte einzufügen und deren Struktur/Funktions-Zusammenhänge zu untersuchen.

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Invitrogen (Karlsruhe), GibcoBRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Fluka (Buchs, Schweiz), BD Biosciences Clontech (Heidelberg), MP Biomedicals (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

7.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen und die entsprechenden Puffer wurden von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) oder von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Für die *site-directed mutagenesis* PCR wurde die *Pfu* DNA-Polymerase, der entsprechende 10 x Puffer und die dNTPs von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Für die *randomized site-directed mutagenesis* PCR wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase von Finnzymes (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) und der dazugehörige 5x Phusion HF-Puffer verwendet.

Für die sonstigen PCR-Reaktionen wurde die *Taq* DNA Polymerase von Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) eingesetzt.

Zum Verdau der Hefezellen wurde die Zymolyase von MP Biomedicals (Illkirch) verwendet.

Für die Ligation wurde mit der T4 Ligase von Fermentas (St. Leon-Rot) oder von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) gearbeitet.

7.1.3 Größenstandards für die Gelelektrophorese

Als Größenstandard wurde hauptsächlich der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Teilweise wurde auch der 1 kb oder 100 bp DNA-Ladder von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) verwendet.

7.1.4 Reaktionssysteme (Kits)

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

GenElute™ High Performance Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research; Orange, USA)

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research; Orange, USA)

DNA-Clean & Concentrator™-25 Kit (Zymo Research; Orange, USA)

Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit™ (Zymo Research; Orange, USA)

Sofern nicht anders angegeben, wurden bei Verwendung der Reaktionssysteme stets die Angaben des Herstellers befolgt.

7.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) wurden von Biomers.net GmbH (Ulm) oder Eurofines MWG/Operon (Ebersberg) synthetisiert. Im Folgenden sind die Primer mit Namen, Sequenz und Verwendungszweck aufgelistet:

Primer für die site-directed mutagenesis der Kcv-TM1-Verlängerungsmutanten:

Kcv-A14 for 5'- CGCGAACTGAACCA**GCA**TTTCATGATACATCTC – 3'

Kcv-A14 rev 5'- GAGATGTATCATGAATGCTGGTTCAGTTCGCG – 3'

Kcv-A15 for 5'- CGAACTGAACCATTC**GCA**ATGATACATCTCTTTATTC – 3'

Kcv-A15 rev 5'- GAATAAAGAGATGTATCATTGCGAATGGTTCAGTTCG – 3'

Kcv-A16 for 5'- CTGAACCATTCATG**GCA**ATACATCTCTTTATTCTCG – 3'

Kcv-A16 rev 5'- CGAGAATAAAGAGATGTATTGCCATGAATGGTTCAG – 3'

Kcv-A17 for 5'- CCATTCATGATAG**GCA**CATCTCTTTATTCTCGC – 3'

Kcv-A17 rev 5'- GCGAGAATAAAGAGATGTGCTATCATGAATGG – 3'

Kcv-A18 for 5'- CATTTCATGATACAT**GCA**CTCTTTATTCTCGC – 3'

Kcv-A18 rev 5'- GCGAGAATAAAGAGTGCATGTATCATGAATG – 3'

Kcv-A19 for 5'- CATGATACATCTC**GCA**TTTATTCTCGCAATG – 3'

Kcv-A19 rev 5'- CATTGCGAGAATAAATGCGAGATGTATCATG – 3'

Kcv-A20 for 5'- GATACATCTCTTT**GCA**ATTCTCGCAATGTTTCG – 3'
 Kcv-A20 rev 5'- CGAACATTGCGAGAATTGCAAAGAGATGTATC – 3'

Kcv-A22 for 5'- CATCTCTTTATTCTC**GCA**GCAATGTTTCGTGATG – 3'
 Kcv-A22 rev 5'- CATCACGAACATTGCTGCGAGAATAAAGAGATG – 3'

Kcv-A24 for 5'- CTTTATTCTCGCAATG**GCA**TTTCGTGATGATCTATAAAATTC – 3'
 Kcv-A24 rev 5'- GAATTTATAGATCATCACGAATGCCATTGCGAGAATAAAG – 3'

Kcv-A26 for 5'- CTCGCAATGTTTCGTG**GCA**ATGATCTATAAAATTC – 3'
 Kcv-A26 rev 5'- GAATTTATAGATCATTGCCACGAACATTGCGAG – 3'

Kcv-A28 for 5'- GCAATGTTTCGTGATGATC**GCA**TATAAATTCTTCCC – 3'
 Kcv-A28 rev 5'- GGGAAGAATTTATATGCGATCATCACGAACATTGC – 3'

Kcv-A30 for 5'- CGTGATGATCTATAAA**GCA**TTCTTCCCGGGAGG – 3'
 Kcv-A30 rev 5'- CCTCCCGGGAAGAATGCTTTATAGATCATCACG – 3'

Kcv-A32 for 5'- GATCTATAAATTCTTC**GCA**CCGGGAGGGTTCG – 3'
 Kcv-A32 rev 5'- CGAACCTCCCGGTGCGAAGAATTTATAGATC – 3'

Primer für die randomized site-directed mutagenesis der Kesv-113NNN-Insertion.

Mit diesen *Primern* sollten insgesamt 9 randomisierte Nukleotide (N) eingefügt werden. Zudem war eine 5'-Phosphorylierung erforderlich (P):

Primer forward: 5'- P - GCCATGTTCTTCNNNNNNNNNGTGATGCTCCCC – 3'

Primer reverse: 5'- P - CAAAATGTGTGCGATGG – 3'

Primer für die Sequenzierung:

Sequenzierungsprimer für den pEGFP-Vektor:

Seq pEGFP 5' - CCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACC - 3'

Sequenzierungsprimer für den pYES2-Vektor:

Seq pYES2 Met25 5' - CTTCGTGTAATACAGGGT - 3'

7.1.6 Plasmide

pEGFP-N2 (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

pEGFP-N2 codiert für eine „red-shift“-Variante des *Green Fluorescent Protein* (GFP). GFP ist ein Protein der Qualle *Aequorea victoria*, das bei entsprechender Anregung fluoresziert. Es dient in dieser Arbeit als Marker für die Genexpression (Prasher, 1992; Chalfie, 1994). Kcv wurde zwischen

die Schnittstellen Bgl II und EcoRI in die *multiple cloning site* (MCS) kloniert und in dieser Arbeit als *Template* für die Herstellung der Kcv-Mutanten verwendet. Alle in dieser Arbeit in HEK293-Zellen untersuchten Kcv-Mutanten wurden als Fusionsprotein mit EGFP hergestellt.

Im Folgenden sind zunächst die Eigenschaften des pEGFP-Vektors aufgeführt:

- *lac Promotor*
- *Multiple Cloning Site*
- *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) Gen
- pUC-Origin für eine hohe Replikationseffizienz in *E.coli*
- Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion transformierter *E.coli*s

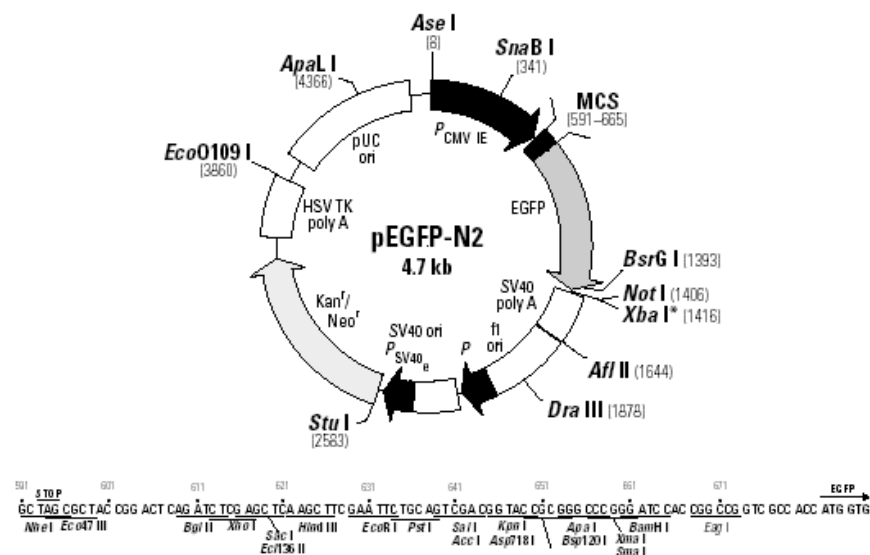


Abb. 7.1: Plasmid pEGFP-N2 mit multipler Klonierungsstelle (MCS) und deren Restriktionsschnittstellen (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe)

Der verwendete Vektor wurde freundlicherweise von Dan Minor (San Francisco) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Version des pYES2-Vektors von Invitrogen.

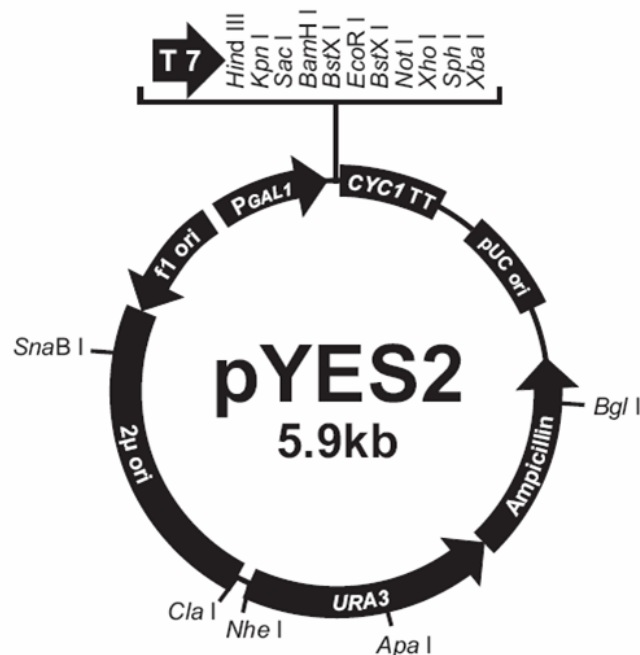
pYES2 ist ein 5.9 kb großer Vektor, der für die Expression von heterologen Proteinen in *S. cerevisiae* geeignet ist. Für diese Arbeit wurde der Vektor an spezifischen Stellen modifiziert.

Im Folgenden sind zunächst die Eigenschaften des unveränderten pYES2-Vektors aufgeführt:

- *Yeast GAL1-Promotor* für eine hohe Expression des rekombinanten Proteins in

Galactose-haltigen Medien und dessen Repression in Glucose-haltigen Medien (Giniger et al., 1985)

- *Multiple Cloning Site*
- das CYC1-Transkriptions-Terminations-Signal führt zu einer effizienten Termination und zu einer hohen Stabilität der mRNA
- pUC-Origin für eine hohe Replikationseffizienz in *E.coli*
- T7-Promotor
- Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion transformierter *E.coli*
- URA3-Gen zur Selektion transformierter Hefen
- 2 μ -Origin für eine hohe Replikationseffizienz in Hefe



- **Abb. 7.2: Plasmid pYES2** mit multipler Klonierungsstelle (MCS) und deren Restriktionsschnittstellen (Invitrogen, Karlsruhe)

Der Originalvektor wurde an folgenden Stellen modifiziert:

- die Pvu1-Schnittstelle an Position 2516 wurde entfernt und durch die Sequenz 5'-GTAGGATCG-3' ersetzt
- ebenfalls wurde die Pvu1-Schnittstelle an Position 4417 entfernt und durch die Sequenz 5'-CAACGATTGGAG-3' ersetzt
- der GAL1-Promotor wurde herausgeschnitten und durch einen Met25-Promoter ersetzt. Durch diese Veränderung wird die Expression des rekombinanten Proteins durch die Anwesenheit von Methionin reprimiert.

7.1.7 Organismen

7.1.7.1 Prokaryotische Organismen

Bakterienstamm *E. coli* XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg)

In dieser Arbeit wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg) mit dem folgenden Genotyp verwendet:

recA1; endA1; gyrA96; thi-1; hsdR17; subE44; relA1; lac[F'; proAB; lacIq ZWM15; Tn10(tetr)]

7.1.7.2 Eukaryotische Organismen

Heterologe Expressionssysteme

Die heterologe Expression von Proteinen, das heißt die Expression in einem fremden Expressionssystem, das normalerweise nicht über das untersuchte Protein verfügt, hat auch für die Erforschung von Ionenkanälen neue Möglichkeiten geschaffen. Als Expressionssysteme wurden in dieser Arbeit *S. cerevisiae* und humane embryonale Nierenzellen (HEK293) verwendet.

Hefestamm *SGY1528* (aus *W303*)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hefestamm *SGY1528* (Tang et al., 1995) verwendet. Auch der Hefestamm wurde freundlicherweise von Dan Minor (San Francisco) zur Verfügung gestellt.

<i>S. cerevisiae</i>	Genotyp	Herkunft
<i>SGY1528</i>	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 trk1::HIS3 trk2::TRP1</i>	D. Minor (San Francisco)

Eukaryotische Zelllinie HEK293

Diese Zelllinie wurde durch Einbringen von gescherter Adenovirus-DNA in embryonale Zellen hergestellt (Graham et al., 1977). Sie wurden zur transienten Expression der Kanalproteine verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM/F12 Medium mit 10 % (v/v) FCS, 2,5 mM Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin. Inkubiert wurden die Zellen in einem CO₂-begasteten Brutschrank unter standardisierten Bedingungen von 37 °C und 4-5 % CO₂.

7.1.8 Geräte

Inkubatoren

- Schrankinkubator (Heraeus, Hanau)
- Schrankinkubator (Mettler, Schwabach)
- Temperatur- und Schüttelinkubator Certomat® HK (Braun, Melsungen)
- CO₂ Incubator Innova® CO-170 (New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen)
- Accu Block™ Digital Dry Bath (Labnet International, Edison, USA)

Zentrifugen

- J2-21 Beckman mit dem Rotor JA14 (Beckman Coulter GmbH; Krefeld)
- Biofuge pico und Biofuge primo R (Heraeus, Hanau)

Mikroskope

- Lichtmikroskop IDO2 (Zeiss, Jena)
- Zeiss Axiovert 100

Weitere Geräte

- PCR-Maschine PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA)
- Autoklav Systec VX-95 (Systec GmbH, Wetzlar)
- Tischwaage Mettler PC 440 (Delta Range, Giessen)
- Destillationsanlage Milli-Q_{plus} (Millipore™, Schwalbach)
- pH-Meter HI 931400 Microprocessor (Hanna Instruments, Kehl)
- Geldoc-System (Pierce Biotechnology GmbH, Erlangen)
- Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (Pierce Biotechnology GmbH, Erlangen)
- Analysenwaage (Sartorius, Göttingen)
- Digitalkamera (Olympus)
- Elektrophoresenetzgerät (Bio-Rad, München)
- EPC9 Verstärker (HEKA, Lambrecht)
- Replica Plater (Bel-Art Products, Pequannock, USA)

7.1.9 Medien & Lösungen

Nährmedien für die Bakterienkulturen

Luria-Bertani-Medium

LB-Medium:

10 g/l Trypton
5 g/l Hefe-Extrakt

	85 mM NaCl pH-Wert 7.5 (1 M NaOH) auf 1 l ddH ₂ O
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar, autoklaviert
für selektive Medien:	LB-Medium oder LB-Agar mit einem Zusatz von 50 mg/l Ampicillin oder Kanamycin. (Zugabe des Antibiotikums erfolgt nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C)
SOC-Medium (Medium für die Transformation)	20 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 8.5 mM NaCl 2.5 mM KCl-Lösung 0.1 M MgCl ₂ -Lösung 20 mM Glucose-Lösung pH-Wert 7.5 (1 M NaOH)
Nährmedien und Lösungen für HEK293-Zellkultur	
HEK293-Medium (Nährmedium)	DMEM/F12 (1:1) Medium 2,5 mM Glutamin 10% FCS 10 ml/l Penicillin/Streptomycin- Lösung
HEK293-Medium (Transfektionsmedium)	DMEM/F12 (1:1) 2,5 mM Glutamin
Transfektionsreagenz	Turbofect (Fermentas, St. Leon Rot)
PBS	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1.4 mM KH ₂ PO ₄ mit 1 M Natronlauge auf pH 7.05 eingestellt und steril filtriert oder autoklaviert

Lösungen für Patch-Clamp-Experimente

Badlösungen

100 mM KCl Badlösung (mit Cholinchlorid):

100 mM Kaliumchlorid
60 mM Cholinchlorid
5 mM HEPES
1.8 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid

100 mM KCl Badlösung (ohne Cholinchlorid):

100 mM Kaliumchlorid
120 mM Mannitol
5 mM HEPES
1.8 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid

100 mM NaCl Badlösung (mit Cholinchlorid):

100 mM Natriumchlorid
60 mM Cholinchlorid
5 mM HEPES
1.8 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid

100 mM NaCl Badlösung (ohne Cholinchlorid):

100 mM Natriumchlorid
120 mM Mannitol
5 mM HEPES
1.8 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid

10 mM BaCl₂ Badlösung:

100 mM KCl Badlösung
10 mM Bariumchlorid

Die Badlösungen wurden mit Tris auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt und sollten eine Osmolarität von ca. 300 mosmol aufweisen.

Pipettenlösung:

130 mM D-Gluconsäure-Kaliumsalz
10 mM Natriumchlorid
5 mM HEPES
5 mM EGTA
0,1 mM GTP
0,1 µM Calciumchlorid
2 mM Magnesiumchlorid
5 mM Phosphocreatin-Dinatriumsalz

Die Lösung wird mit KOH auf pH 7,4 eingestellt und sollte eine Osmolarität von ca. 330 mosmol aufweisen.

Nährmedien und Lösungen für Hefekulturen**YPD(A)+50 mM KCl-Medium**

10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Bactopepton
20 g/l Glucose
100mg/l Adeninsulfat
50mM KCl
Für Agar-Platten: 2% Agar

SD (-ura)+A+50 mM KCl-Medium

26,7 g/l SD-Base
0,77 g/l Supplement(-ura)
0,1 g/l Adeninsulfat
50mM KCl
pH mit KOH auf 5,5
Für Agar-Platten: 2% Agar

100 mM KCl - non selective plates

20 g/l Bacto-Agar
1,5 g/l Supplement (-ura/-met)
6,7 g/l Yeast Nitrogen Base (without amino-acid)
100mM KCl
20 g/l Glucose
pH mit FreeTrisBase auf 6,5

1 mM KCl - selective plates

15 g/l Agarose (Sigma purified Agar)
1,5 g/l Supplement (-ura/-met)
2,1 g/l Arginine Base
1mM KCl
10 g/l Glucose
1mM MgSO₄
0,1mM CaCl₂
1 ml/l Vitaminlösung
1 ml/l Spurenelementlösung
pH mit Phosphorsäure auf 6

0,5 mM KCl - non selective plates

15 g/l Agarose (Sigma purified Agar)
1,5 g/l Supplement (-ura/-met)
2,1 g/l Arginine Base
0,5mM KCl
10 g/l Glucose
1 mM MgSO₄
0,1 mM CaCl₂
1 ml/l Vitaminlösung
1 ml/l Spurenelementlösung
pH mit Phosphorsäure auf 6

10x LiAc	1 M LiAc
10x TE	100 mM TrisCl 10 mM EDTA
1x LiAc/TE-Lösung	1 ml 10x LiAc 1 ml 10x TE 8 ml ddH ₂ O
LiAc/TE/Glycerin-Lösung	1 ml 10x LiAc 1 ml 10x TE 1,5 ml Glycerin (99%) 6,5 ml ddH ₂ O
50%ige PEG-Lösung	4g Polyethylenglykol (PEG) 4000 1 ml ddH ₂ O
PEG/LiAc/TE-Lösung	8ml 50%ige PEG-Lösung 1 ml 10xTE 1 ml 10xLiAc →steril filtrieren
Spurenelementlösung (Rezept für 100ml)	Borsäure 0,05g CuSO ₄ 0,004g KI 0,01g FeCl ₃ 0,05g MnSO ₄ 0,04g Molybdänsäure 0,09g ZnSO ₄ 0,04g konz. Salzsäure 1ml →steril filtrieren
Vitaminlösung (Rezept für 100ml)	Biotin 100x : 0,02g 100ml D-Pantothensäure 0,04g Nicotinsäure 0,04g Pyridoxin 0,04g Thiamon 0,04g Inositol 0,2g →steril filtrieren
Medien und Lösungen für die Gelelektrophorese	
1% Agarose Gel (30 ml)	0.3 g Agarose 30 ml 1x TAE-Puffer

50x TAE-Puffer

2 M Tris
 1 M Eisessig
 50 mM EDTA, pH 8.0
 mit ddH₂O auf 1 l auffüllen

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, die zur Vervielfältigung von DNA herangezogen wird. Ein DNA-Abschnitt, der zwischen zwei bekannten Oligonukleotid-Sequenzen liegt, wird mit der *Pfu*-Polymerase exponentiell amplifiziert. Die Amplifikation besteht aus drei Schritten, die sich in einer festgelegten Anzahl von Zyklen wiederholen. Der erste Schritt besteht aus der Denaturierung. Hierbei wird das doppelsträngige DNA-Template aufgeschmolzen. Im folgenden Annealing-Schritt binden die Oligonukleotid-Primer an die DNA und während der Elongation werden die 3'OH-Enden der Oligonukleotide durch die Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert. Es entstehen Sequenzen, die komplementär zur Matrize sind. Auf diese Weise wird die DNA exponentiell angereichert.

***Site directed* Mutagenese**

Durch die *site directed mutagenesis* können Basen an einer genau definierten Position einer DNA-Sequenz leicht eingefügt, mutiert und entfernt werden. Dazu werden *Primer* hergestellt, in denen die gewünschte Veränderung enthalten ist.

Für die Konstruktion der Kcv-Mutanten wurde das Protokoll des *QuickChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verwendet. In dieser PCR-basierten Methode wurde das Konstrukt Kcv-pEGFP *Template* zusammen mit den entsprechenden Mutagenese-*Primern* eingesetzt.

Es wurde ein 50 µl Ansatz mit 30-50 ng *template*-DNA, 40 mmol dNTP-Mix (10 mmol je dNTP), je 125 ng eines Vorwärts- und eines Rückwärts-*Primers*, 5 µl des 10x Reaktions-Puffers und 3 U *Pfu*-DNA Polymerase eingesetzt.

PCR-Programm:

	5 min 95 °C (Denaturierung der DNA)
18 Zyklen mit	30 s bei 95 °C (Denaturierung der DNA)
	1 min bei 55 °C (Hybridisierung der <i>Primer</i>)
	11 min bei 68 °C (Elongation durch die <i>Pfu</i> -Polymerase)
	10 min 68 °C (Auffüllen unvollständiger Amplifikate)
	4 °C Stopp der Reaktion

Zum Verdau der methylierten, nicht mutierten *template*-DNA, wurden die PCR Produkte mit 10 U *DpnI* für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Hitze-Schock Transformation von *E.coli*.

Hefe-Kolonie-PCR

Kam es auf selektiven Platten zu einem deutlichen Wachstum von Hefekolonien (siehe auch Abb.5.2), die zuvor mit randomisierter DNA transformiert wurden, wurde diese gepickt, mit Zymolyase verdaut und eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden die *Primer* so ausgewählt, dass ein Primer *Upstream* des *Inserts* und der zweite *Downstream* des *Inserts* binden konnten. Auf diese Weise wird ausschließlich die Sequenz des *Inserts* aus dem Vektor exponentiell amplifiziert.

Es wird ein 50 µl Ansatz mit 4,2 µl der mit Zymolyase verdauten Hefezellen, 10µl des 5x Taq-Puffers, 40 mmol dNTP-Mix (10 mmol je dNTP), je 100 ng des Vorwärts- und des Rückwärts-*Primers* sowie 0,5 µl der Taq-Polymerase eingesetzt.

PCR-Programm:

	10 min 95 °C (Aufschluss der Hefen)
30 Zyklen mit	1 min bei 95 °C (Denaturierung der DNA)
	1 min bei 55 °C (Hybridisierung der <i>Primer</i>)
	30 sec bei 72 °C (Elongation durch die Taq-Polymerase)
	4 min 72 °C (Auffüllen unvollständiger Amplifikate)
	4 °C Stopp der Reaktion

Das Produkt der Kolonie-PCR wurde im Anschluss in einer Gelelektrophorese überprüft, aufgereinigt und zum Sequenzieren geschickt.

7.2.2 Ligation

Durch eine Ligation können amplifizierte DNA-Fragmente und linearisierte Plasmid-DNA, die zuvor mit spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, verbunden werden. Die Ligation wurde außerdem dazu verwendet die im Rahmen der *randomized site directed mutagenesis* amplifizierten PCR-Produkte mit Hilfe der verwendeten 5'-phosphorylierten *Primer* direkt nach der PCR zu circulären Plasmid-DNA zu schließen.

Folgender Ligationsansatz wurde standardmäßig verwendet:

2 µl Reaktionspuffer [10x]
1 µl T4 DNA-Ligase [400 U/µl]
Linearisiertes Plasmid [25 ng/µl]
Geschnittenes Fragment [125 ng/µl]
ad 20 µl ddH ₂ O

Der Ansatz wurde für 4 h bei 16°C inkubiert und danach für 15 min bei 65°C inaktiviert. Durch das Erhitzen wird der DNA-Ligase-Komplex zerstört und die Aufnahmewahrscheinlichkeit der ligierten DNA bei der Hitzeschocktransformation erhöht. Im Ligationsansatz der *randomized site directed mutagenesis* wurde die aufgereinigte PCR-Probe verwendet.

7.2.3 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA bzw. zu ihrem gezielten Abbau dienten spezifisch spaltende Restriktionsenzyme. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den diesbezüglichen Vorschriften der Herstellerfirmen.

7.2.4 Plasmidpräparationen

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde mit dem *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* von Sigma nach Vorschrift durchgeführt. Zur Elution der DNA wurden jedoch 50 µl H₂O Bidest (pH ca. 7) anstatt des mitgelieferten Puffers verwendet. Größere Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit wurden mit dem *GenElute™ Plasmid Midiprep Kit* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Jedoch wurde die Plasmid-DNA mit H₂O Bidest (pH ca. 7) anstatt des mitgelieferten Puffers eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

7.2.5 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der DNA wurde der *DNA Clean & Concentrator 25 Kit* von Zymo-Research verwendet. Bei der Durchführung wurde stets nach Herstellerangaben gearbeitet, mit der Ausnahme, dass im finalen Elutionsschritt anstelle des mitgelieferten Puffers mit H₂O Bidest (pH ca. 7) eluiert wurde.

7.2.6 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Teilchen mit unterschiedlicher Ladung und Größe in einem elektrischen Feld mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe, Masse und Form der Moleküle ab. Hierbei wandern die geladenen Nukleinsäuren, die über einen sehr großen pH-Bereich negativ geladen sind, in Richtung Anode. Ladungsträger der negativen Ladung sind dabei die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der Nukleinsäuren.

Die Gelelektrophorese diente in dieser Arbeit der qualitativen Analyse von DNA. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit 0,8-1,2 µl Ethidiumbromid 1:10000 (w/v) versetzt. Als Trägermaterial wurde Agarose verwendet; in den meisten Fällen wurden 1 %ige Agarose-Gele in 1 x TAE-Puffer verwendet.

Die jeweiligen Proben wurden mit 5 x TAE-Probenpuffer (50 % Glycerin, 1 % Bromphenolblau) versetzt und in eine Geltasche gefüllt. Gelläufe erfolgten bei 100 V für ca. 60 min. Ein wichtiges Hilfsmittel zur Charakterisierung der Fragmentgrößen sind die Größenstandards, die DNA-Fragmente mit genau definierten Größen enthalten.

7.2.7 Quantifizierung der DNA-Proben

Die Konzentrationen wässriger DNA-Lösungen wurden spektralphotometrisch anhand der Absorption von Licht bei 260 nm ermittelt (Nano-Drop ND-1000 Spektralphotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Dabei wurde eine optische Dichte ($OD_{260\text{ nm}}$) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA gleichgesetzt. Die Reinheit der Lösung wurde durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt. Ein Verhältnis von über 1,8 gilt als Maß für geringe Verunreinigung durch Proteine (Sambrook *et al.*, 1989).

7.2.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen aller Konstrukte wurden kontrolliert. Die Sequenzierungen wurden von den Firmen Seqlab (Göttingen) oder StarSeq (Mainz) durchgeführt. Die Startpunkte der Sequenzierung wurden durch entsprechende Sequenzierungs-*Primer* gewählt.

7.3 Kultivierung von *E. coli*

Zur Klonierung von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm *XLBlue1* verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Medium nach Luria und Bertani (LB-Medium) (Bertani 1952).

Für das Wachstum auf Agarplatten wurde das Flüssigmedium mit 15 g/l Agar versetzt. Die Bakterien-Stammkulturen, die als Glycerinsuspension (58 %) bei –80 °C lagerten, wurden bei Bedarf auf LB-Agarplatten mit einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien dieser Übernachtskultur wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet. Zur Selektion von Transformanten diente LB-Medium oder LB-Agar mit einem Zusatz von 50 mg/l Kanamycin (pEGFP-N2) bzw. 50 mg/l Ampicillin (pYES2). Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C.

7.3.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Stamm: *E.coli* XL1-Blue

Ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde mit 500 µl LB-Medium befüllt. Anschließend wurden die tiefgefrorenen Bakterien mit einem autoklavierten Zahnstocher in das Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 37°C in den Schüttler gestellt und für 20-25 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 80 µl der Probe auf vorgewärmte LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einem Plastik-Spatel wurde eine einzelne Kultur abgezogen und mit 3 ml LB-Medium in 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Das Greiner-Röhrchen wurde im Schüttler bei 37 °C für ca. ½ Tag inkubiert.

In einen 250 ml-Kolben wurden 100 ml SOB-Medium (2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl) und ein Rührfisch gegeben. Dieser Kolben wurde in eine Wasserschale gestellt, die wiederum auf einem Rühr Tisch stand (das Wasser hatte die Funktion die Temperatur der Kultur bei ca. 18 °C zu halten). In den Kolben wurden 3 ml der Vorkultur gegeben. Unter Rührung wurde die Kultur über Nacht inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ hatte die Kultur die optimale Populationsdichte erreicht. Anschließend wurde der Kolben für 10 min auf Eis inkubiert und die Probe in 250 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und 30 ml eiskalte TB-Waschlösung (3,02 g/l Pipes, 2,2 g/l CaCl₂*H₂O, 18,64 g/l KCl, 10,88 g/l MgCl₂*4H₂O auf pH von 6,7-7 mit KOH einstellen) zugegeben. Damit sich das Pellet löst, wurde gevortext. Dann konnte die Probe in 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und zunächst für 10 min auf Eis inkubiert werden. Anschließend wurde erneut für 10 min bei 4 °C und 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und 12,8 ml eiskalte TB-Waschlösung zugegeben. Es wurde vorsichtig resuspendiert bis die Lösung homogen trüb war. Dann wurden 0,56 µl DMSO dazugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden Stammlösungen von je 100 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt und bei –80 °C gelagert.

7.3.2 Hitze-Schock-Transformation chemisch kompetenter Zellen

Bei –80 °C gelagerte, kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 50 µl Zellsuspension mit 1-2 µl (50-500 ng) Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert, danach für 1 min bei 42 °C erwärmt und wieder für 2 min auf Eis gehalten. Die Antibiotikaresistenz wurde für 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln in 250 µl SOC-Medium in Abwesenheit von Antibiotika exprimiert. Der Transformationsansatz wurde auf selektive LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.4 Zellkultur

7.4.1 Zellkulturführung

Das Arbeiten mit HEK293-Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank (Flow Laboratories), welche vor und nach Benutzung mit 70 %igem Ethanol gereinigt wurde. Medien und Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

HEK293-Zellen wachsen als adhärente Zellen. Nach Erreichen der Konfluenz und Ausbildung eines dichten Zellrasens mussten die HEK293-Zellen verdünnt und umgesetzt, d.h. passagiert werden. Die Kultivierung erfolgte in Zellkultur-Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² und Filterschraubkappen für den CO₂-Austausch (Renner GmbH, Dannstadt).

Wenn eine Konzentration von ungefähr 10⁶ Zellen/ml erreicht war, erfolgte eine Passage. Hierfür wurden die zu passagierenden Zellen vom Nährmedium befreit, mit 2 ml PBS gewaschen und nach Absaugen des PBS mit 1 ml Trypsin-EDTA beschichtet, um die Zellen abzulösen. In der Regel war eine Einwirkzeit von 2-3 Minuten erforderlich. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden zur Zellsuspension 5 ml Nährmedium gegeben und gemischt. Ein Aliquot von 0,7-1,2 ml wurde in eine neue Zellkultur-Flaschen, in die bereits 5 ml Nährmedium vorgelegt waren, überführt und wie unter 7.1.7.2 kultiviert.

7.4.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung von Fremd-DNA in Eukaryotenzellen. Mit Hilfe dieser Methode konnten die zu untersuchenden Kcv-Mutanten in den HEK293-Zellen heterolog exprimiert werden.

Zur Expression von Kcv und Kcv-Mutanten wurden HEK293-Zellen in 35 mm Kulturschälchen (Renner GmbH, Dannstadt) ausgesät, zu 40-60 % konfluent wachsen lassen und mit *Metafectene*TM (Biontex, München), Transfectin (BioRad, München) oder Turbofect (Fermentas, St. Leon Rot) transfiziert. Dazu wurden für jede Transfektion in zwei getrennte Eppendorf-Reaktionsgefäße zunächst 50 µl serum- und antibiotikafreies Medium vorgelegt. In das eine Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden anschließend 2 µl des jeweiligen Transfektionsreagenzes und in das andere Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 µg der DNA-Probe gegeben und gut resuspendiert. Dann wurden beide Eppendorf-Reaktionsgefäße zusammengeführt und für 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit konnte bei Bedarf aus den Kulturschälchen das Medium abgezogen und durch 1 ml Transfektionsmedium (serum- und antibiotikafreies Medium) ersetzt werden. Nachdem die Transfektions-Lösung in die Schälchen gegeben wurde, erfolgte die Transfektion bei einer Inkubation für drei Stunden im Inkubator. Die Transfektion wurde gestoppt, indem das Medium abgezogen und durch normales Kulturmedium ersetzt wurde. Bei Verwendung von Turbofect als Transfektionsreagenz konnte die Transfektionslösung zu serum- und antibiotikahaltigen Medium gegeben und über Nacht inkubiert werden.

7.5 Kultivierung von Hefezellen

7.5.1 Herstellung einer Hefe-Vorkultur

Vorkulturen wurden entweder aus Glycerinkulturen oder von Agarplatten angeimpft. Beim Animpfen der Vorkulturen von Agarplatten, wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Kolonie gepickt und in ein Reagenzglas mit dem entsprechenden Flüssigmedium überführt. Zum Animpfen aus den Glycerinkulturen wurden die Glycerinstammlösungen aufgetaut und anschließend 10-50 µl in die Reagenzgläser mit den entsprechenden Medien überführt.

7.5.2 Herstellung kompetenter Hefen mit der LiAc-Methode

Ein Reagenzglas mit 10 ml YPD(A)+50mMKCl-Flüssigmedium wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30°C und 200 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. Diese Starterkultur kann bei 4°C bis zu 4 Wochen aufgehoben werden.

Zur Herstellung der kompetenten Hefen wurden in einem Erlenmeyerkolben 50 ml YPD(A)+50mMKCl-Flüssigmedium vorgelegt und mit 3 µl (*) der Starterkultur angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 30°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert (* das Volumen von 3 µl ist ideal für einen Wachstumszeitraum von 18.00 Uhr bis 8.30 Uhr am nächsten Morgen). Die OD₆₀₀ sollte am Morgen zwischen 0,8 und 1,0 liegen.

Anschließend wurde die Zellsuspension auf je 2 sterile 25 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 6 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in je 8 ml (1/3 des Ausgangsvolumens) steriler LiAc/TE-Lösung resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 6 min bei 4000rpm. Das erhaltene Pellet wurde in jeweils 0,25 ml steriler LiAc/TE-Lösung (1/100 des Ausgangsvolumens) resuspendiert und anschließend wurden jeweils zwei Ansätze in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengeführt und für 1h bei 30°C und 75 rpm inkubiert.

Die kompetenten Hefezellen können bei Raumtemperatur einige Stunden aufbewahrt werden, sollten aber so schnell wie möglich zur Transformation verwendet werden. Falls die Transformation nicht am selben Tag erfolgt, müssen die Hefezellen bei -80°C tiefgefroren werden. Dazu wurden die Zellen bei 5000rpm für 1min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgezogen. Das Pellet wurde in 0,5 ml einer LiAc/TE/15%-Glycerol-Lösung resuspendiert und bei -80°C gelagert.

7.5.3 Transformation der Hefen mit der LiAc-Methode

Zunächst wurden kompetente Hefen langsam auf Eis aufgetaut. Heringssperma-DNA wurde in einem Thermoblock 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die denaturierte

Heringssperma-DNA wurde in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt und entsprechende Volumina an Plasmid-DNA zupipettiert. Jeder Ansatz sollte 1 µg pDNA enthalten. Anschließend wurden jeweils 100 µl kompetente Hefezellen zugegeben und gemischt. Des Weiteren wurden 0,6 ml frisch angesetzte und sterile PEG/LiAc/TE-Lösung zugegeben, kurz gevortext und bei 30°C und 200rpm für 30 min inkubiert.

Für den Hitzeschock wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße 15 min bei 42°C in den Thermoblock gestellt und im Anschluss direkt für 3 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert, um das Pellet in 0,3ml 1xTE-Puffer resuspendieren zu können. Von jedem Ansatz wurden 150 µl in die Mitte einer SD (-ura)+A+50K-Agarplatte aufgebracht und mit dem Drigalsky-Spatel ausplattiert.

Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert bis Kolonien gewachsen sind. Im Anschluss wurden von den transformierten Hefen Glycerin-Stammlösungen angefertigt. Dazu wurde mit sterilen Zahnstochern von jeder Platte jeweils eine Kolonie gepickt und in sterile Reagenzgläser mit Überfallkappe mit 10 ml SD(-ura)+A+50K-Flüssigmedium überimpft. Diese Kultur wurde für 3-4 Tage bei 30°C und 200rpm im Schüttler inkubiert.

Von diesen Vorkulturen wurden die Stammlösungen angefertigt. Dazu wurden 0,5 ml steriles Glycerin (40%) und 0,5 ml der Vorkultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengeführt und gut gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Der Rest der Vorkultur konnte für den Komplementationstest verwendet werden.

7.5.4 Herstellung kompetenter Hefen mit dem Frozen-EZ Yeast Transformation Kit™ (Zymo Research; Orange, USA)

Alternativ zur LiAc-Methode können auch mit dem *Frozen-EZ Yeast Transformation Kit* von Zymo Research kompetente Hefen hergestellt werden. Die Durchführung erfolgte, wie in der Anleitung beschrieben. Anschließend wurden die Hefen zu Proben von je 100 µl bei -80°C aliquotiert.

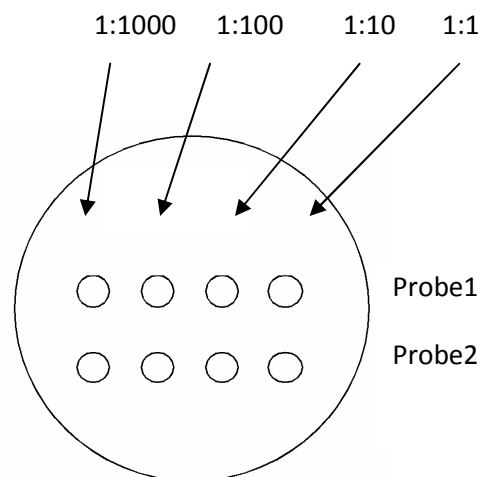
7.5.5 Transformation kompetenter Hefen mit dem Frozen-EZ Yeast Transformation Kit™ (Zymo Research; Orange, USA)

Um die Hefen mit der gewünschten DNA zu transformieren, kann auch mit dem *Frozen-EZ Yeast Transformation Kit* von Zymo Research gearbeitet werden. Dazu wurden die kompetenten Hefen

langsam auf Eis aufgetaut. Der weitere Vorgang ist der Anleitung des *Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit™* (Zymo Research; Orange, USA) zu entnehmen.

7.5.6 Hefekomplementationstest

Für den Hefekomplementationstest wurden 5 ml Vorkulturen von SD(-ura)+A+50mMKCl-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Diese Kultur wurde für 2-3 Tage bei 30°C und 200rpm im Schüttler inkubiert. Sobald ausreichend Hefen gewachsen sind, wurden die kompletten Proben in sterile Falcons überführt und bei 4000 rpm zentrifugiert (sollte eine Probe ein besseres Wachstum aufweisen, reicht es aus, 1ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß zu überführen und bei 4000 rpm zu zentrifugieren). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml H₂O-Bidest resuspendiert. Die Probe wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nochmals in 1ml H₂O-Bidest resuspendiert und abzentrifugiert um letzte Mediumrückstände auszuwaschen. Für den Tröpfchentest wurde die OD₆₀₀ mit dem Nanodrop (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen) auf ca. 1 eingestellt und daraus wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 mit H₂O-Bidest hergestellt. Die Verdünnungen wurden gründlich gevortext und je 7µl nach dem dargestellten Muster auf die Platten aufgetragen:



→100mM KCl-non selective plates

→1mM KCl- selective plates

→0,5mM KCl- selective plates

7.5.7 Replica Plating

Die Technik des *Replica Platings* ist eine elegante Methode, um Kolonien von einer Agar-Platte auf eine andere Agar-Platte zu übertragen. Auf diese Weise ist es möglich alle Transformanten auf

verschiedenen Medien und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu beobachten und bei Bedarf mit unterschiedlichen Selektionsmarkern zu selektieren. Beim *Replica Plating* wurde zunächst ein Samttuch auf einen Stempel (Bel-Art Products, Pequannock, USA) gespannt. Auf dieses Samttuch wurde die Master-Agarplatte mit den gewachsenen Kolonien unter leichtem Druck kurz aufgesetzt, so dass ein Teil einer jeden Kolonie auf der Oberfläche des Samttuchs verbleibt. Im Anschluss kann somit das Koloniemuster auf eine neue sterile Agarplatte gespiegelt werden. Diese Technik erlaubt es in einem Arbeitsschritt hunderte von Kolonien zu übertragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Übertragungstechnik des *Replica Platings* genutzt, um randomisiert-transformierte Hefezellen von nicht-selektiven Platten auf selektive Platten zu übertragen.

7.5.8 Zymolyase-Verdau von Hefezellen

Um die Effizienz einer Hefe-Kolonie-PCR zu erhöhen, empfiehlt es sich die Hefe-Zellen zuvor mit Zymolyase zu verdauen. Dieses Enzym spaltet die Glucose-Polymere der Zellwand der Hefen, indem es die β -1,3-Glucan-Verknüpfungen hydrolysiert.

Beim Zymolyase-Verdau wurden zu 4 μ l H₂O-Bidest 0,2 μ l Zymolyase (20mg/ml) gegeben und darin die Hefekolonie resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss kann der komplette Ansatz als *template* für die nachfolgende Hefe-Kolonie-PCR verwendet werden.

7.6 Patch-Clamp-Technik

Die Technik der *Patch-Clamp*-Messung wurde von Neher und Sakmann entwickelt (Neher und Sakmann 1976). Dabei wird der Strom durch eine sehr kleine, wenige μm^2 große Fläche (*patch*) der Membran gemessen, an die eine vorgegebene Spannung (*clamp*) angelegt wird. Der gemessene Strom liegt je nach Konfiguration der Messung in einem Größenbereich von einigen Picoampere bis zu mehreren Nanoampere. Um einen sehr kleinen Abschnitt der Zellmembran elektrisch von seiner Umgebung zu isolieren, muss eine sehr dichte Verbindung zwischen Glas und Membran im Gigaohm-Bereich entstehen; man spricht von einem *Gigaseal*. Nachdem sich ein solcher *Gigaseal* gebildet hat, kann man für verschiedene Spannungen den Strom, der über die Membran mit den enthaltenen Kanälen fließt, mit einem *Patch-Clamp*-Verstärker messen.

Experimente an HEK293-Zellen wurden an Zellen durchgeführt, die 2 Tage nach der Transfektion bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Einen Tag vor dem Experiment wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von den Kulturschälchen abgelöst, in einer geringeren Zelldichte auf neuen Kulturschälchen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Messungen wurden an diesen vereinzelt

Zellen in der „*whole cell*“-Konfiguration (Hamill *et al.* 1981) mit einem EPC-9 Verstärker (HEKA, Lambrecht) durchgeführt. Die „*whole cell*“-Konfiguration ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden der *Patch-Clamp*-Technik. Bei dieser Methode wird der Strom über die gesamte Membran gemessen. Diese Messungen geben somit das makroskopische Strommuster einer Zelle wieder, ohne dass man unmittelbar den Beitrag der einzelnen Kanäle erkennen kann. Um in die *whole-cell*-Konfiguration zu gelangen, wurde zunächst ein *cell-attached*-Patch hergestellt und dann durch mechanisches Saugen der Membranbereich unter der Pipette durchbrochen. In der *whole-cell*-Konfiguration tauscht sich nach kurzer Zeit der mobile Teil des Cytoplasmas mit der Pipettenlösung aus. Man hat damit eine klar definierte Zusammensetzung des Zellinneren.

Die Aufnahme der *Patch-Clamp*-Daten erfolgte mit der Patchmaster Software (HEKA). Ganzzellströme wurden angeregt durch 800 ms-Spannungspulse zwischen +60 mV und –160 mV, die von einer Haltespannung von 0 mV ausgingen. Die Ströme wurden mit einer Rate von 4 kHz aufgezeichnet und ohne die Subtraktion von Leckströmen analysiert.

Die gewonnenen Daten wurden mit den Programmen Fitmaster (HEKA) und Igor Pro Version 5.01 (WaveMetrics) analysiert.

7.7 Sterilität

Lösungen, Nährmedien, Puffer, Einmalplastikmaterialien und Glasmaterial wurden 20 min in feuchter Hitze bei 1,5 bar/121 °C autoklaviert. Die Sterilisation von Glaspipetten erfolgte über 4-5 h bei 180 °C im Trockenschrank. Thermolabile Lösungen und Puffer wurden durch Sterilfiltration (0,2 µm Filter / Schleicher & Schuell) entkeimt.

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur, sowie ein Teil der molekularbiologischen Arbeitsschritte, wurden mit Handschuhen unter einem Reinraumgerät durchgeführt, welches mit 80 % Ethanol und UV-Licht keimfrei gehalten wurde.

7.8 Software und Internetadressen

Zur Auswertung und Analyse der Patch-Clamp Daten wurden die Programme Excel (Microsoft), Igor Pro Version 5.01 (WaveMetrics), sowie Patchmaster und Fitmaster (HEKA) benutzt.

Zur Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen wurde die Software Gentle verwendet.

Folgende hilfreiche Analyse-Tools sind im Internet frei verfügbar:

Sequence Manipulation Suite	http://www.bioinformatics.org/sms/
Webcutter 2.0	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/
Genestream	http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi
Expasy-Tools	http://expasy.org/tools/
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP
TMHMM 1.0 und 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
TMHMMfix	http://www.sbc.su.se/~melen/TMHMMfix

Sequenz-Datenbanken:

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Genbanknummern:

Das *Paramecium bursaria* Chlorellavirus (PBCV-1)-Genom ist unter NC_000582 eingetragen. Die Sequenz von ORF a250r (Kcv) hat die Zugangsnummer AY3382212.

Das Genom von *Ectocarpus siliculosus* Virus (EsV-1) ist unter NC_002687 eingetragen. Die Sequenz von ORF 223 (Kesv) ist unter AAK14637 zu finden.

8 Referenzen

- Abenavoli A, DiFrancesco ML, Schroeder I, Epimashko S, Gazzarrini S, Hansen UP, Thiel G, Moroni A** (2009) Fast and slow gating are inherent properties of the pore module of the K⁺ channel Kcv. *J Gen Physiol.* 134(3):219-29
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF** (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS USA* 89, 3736-3740
- Ashcroft FM** (2000) Ion Channels and Disease: Channelopathies. *Academic Press*.
- Atkins P** (2001) Physical Chemistry. *W H Freeman & Co*
- Balss J, Papatheodorou P, Mehmehl M, Baumeister D, Hertel B, Delaroque N, Chatelain FC, Minor DL Jr, Van Etten JL, Rassow J, Moroni A, Thiel G** (2008) Transmembrane domain length of viral K⁺ channels is a signal for mitochondria targeting. *PNAS* 105(34):12313-8
- Balss J** (2007) Unterschiedliche zelluläre Sortierung zweier viraler K⁺-Kanäle: Die Bedeutung der zweiten Transmembrandomäne als Sortierungssignal. Doktorarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Baumeister D** (2006) Struktur-Funktionsbeziehung des viralen Kalium-Kanals Kcv. Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Berneche S, Roux B** (2001) Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* 414: 73–7
- Bertani G** (1952) Studies on lysogenesis. *J. Bacteriol.* 62, 293-300
- Bertl A, Bihler H, Kettner C, Slayman CL** (1998) Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*. *Pflugers Arch* 436: 999–1013
- Bertl A, Slayman CL, Gradmann D** (1993) Gating and Conductance in an Outward-Rectifying K⁺ Channel from the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membrane Biol.* 132:183-199
- Bertl A, Blumwald E, Coronado R, Eisenberg R, Findlay G, Gradmann D, Hille B, Köhler K, Kolb HA, MacRobbie E** (1992) Electrical measurements on endomembranes. *Science* 258: 873–874
- Bichet D, Haass FA, Jan LY** (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 957-967
- Bihler H, Slayman CS, Bertl A** (1998) NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 432:59-64
- Blunck R, Cordero-Morales JF, Cuello LG, Perozo E, Bezánilla F** (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *J Gen Physiol.* 128(5):569-81
- Carrasco** (1995) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adva. Virus Res.* 45, 61-112
- Chatelain FC, Gazzarrini S, Fujiwara Y, Arrigoni C, Domigan C, Ferrara G, Pantoja C, Thiel G, Moroni A, Minor DL Jr** (2009) Selection of inhibitor-resistant viral potassium channels identifies a selectivity filter site that affects barium and amantadine block. *PLoS One* 4(10):e7496
- Chalfie M** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805
- Cordero-Morales JF, Jogini V, Lewis A, Vásquez V, Cortes DM, Roux B, Perozo E** (2007) Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(11):1062-9
- Domene C, Sansom MSP** (2003) A potassium channel, ions and water: simulation studies based on the high resolution x-ray structure of KcsA. *Biophys. J.* 85, 2787-2800
- Domene C, Bond P, Sansom MSP** (2003) Membrane protein simulation: ion channels and bacterial outer membrane proteins. *Adv. Protein Chem.* 66, 159-193

- Domene C, Bond P, Deol SS, Sansom MSP** (2003) Lipid-protein interactions and the membrane/water interfacial region. *J. Am. Chem. Soc.* 125,14966-14967
- Doyle DA** (2004) Structural changes during ion channel gating. *Trends Neurosci* 27(6):298-302
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R** (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77
- Dumas F, Lebrun MC, Tocanne JF** (1999) Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Letters* 458, 271-277
- Eing C** (2006) Funktionale Charakterisierung pflanzlicher Kaliumkanäle in *Saccharomyces cerevisiae*. Universität Karlsruhe, Dissertation
- Frohns F, Käsmann A, Kramer D, Schäfer B, Mehmel M, Kang M, Van Etten JL, Gazzarrini S, Moroni A, Thiel G** (2006) Potassium ion channels of Chlorella viruses cause rapid depolarization of host cells during infection. *J Virol.* 80(5):2437-44
- Gaber RF, Styles CA, Fink GR** (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:2848-2859
- Gazzarrini S, Severino M, Lombardi M, Morandi M, DiFrancesco D, Van Etten JL, Thiel G, Moroni A** (2003) The viral potassium channel Kcv: structural and functional features. *FEBS Lett.* 552, 12-16
- Gazzarrini S, Van Etten JL, DiFrancesco D, Thiel G, Moroni A** (2002) Voltage-Dependence of Virus-encoded Miniature K⁺ Channel Kcv. *J. Membrane Biol.* 187, 15-25
- Giniger E, Varnum SM, Ptashne M** (1985) Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40: 767–774
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG** (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274(5287):546, 563-7
- Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, Pausch MH** (1996) ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 93, 13256-13261
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72
- Gruia AD, Fischer S, Smith JC** (2004) Kinetics of breaking a salt-bridge critical in protein unfolding *Chemical Physics Letters* 385, 337–340
- Hammil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ** (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100
- Haro R and Rodriguez-Navarro A** (2002) Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 114-122
- Hazama A, Loo DD, Wright EM** (1997) Presteady-state currents of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *J Membr Biol.* 155(2):175-86
- Hertel B, Tayefeh S, Kloss T, Hewing J, Gebhardt M, Baumeister D, Moroni A, Thiel G, Kast SM** (2009) Salt bridges in the miniature viral channel Kcv are important for function. *Eur Biophys J.* 24
- Hertel B, Tayefeh S, Mehmel M, Kast SM, Van Etten JL, Moroni A, Thiel G** (2006) Elongation of Outer Transmembrane Domain Alters Function of Miniature K⁺ Channel Kcv. *Journal of Membrane Biology* 210, 21-29
- Hertel B** (2005) Struktur-Funktionsbeziehung in dem minimalen viralen Kalium-Kanal Kcv. Doktorarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Hessa T, Kim H, Bihlmaier K, Lundin C, Boekel J, Andersson H, Nilsson I, White SH, von Heijne G** (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* 433, 377-381

- Hille B** (2001) Ion channels of excitable membranes. *Sinauer Associates Inc., Sunderland*
- Jäckel C, Kast P, Hilvert D** (2008) Protein design by directed evolution. *Annu Rev Biophys.* 2008;37:153-73
- Jan LY, Jan YN** (1992) Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 537-555
- Jiang B, Sun X, Cao K, Wang R** (2002) Endogenous K_v channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Mol. Cell. Biochem.* 238, 69-79
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2002a) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417, 515-522
- Kang M, Graves M, Mehmel M, Moroni A, Gazzarrini S, Thiel G, Gurnon JR, VanEtten JL** (2004a) Genetic diversity in chlorella viruses flanking kcv, a gene that encodes a potassium ion channel protein. *Virology* 326, 150-159
- Kang M, Moroni A, Gazzarrini S, DiFrancesco D, Thiel G, Severino M, VanEtten JL** (2004b) Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses. *PNAS* 101, 5318-5324
- Kawakami H, Kawakami N** (1978) Behavior of a virus in a symbiotic system, *Paramecium bursaria-zoochlorella*. *J. Protozool.* 25, 217-225
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA** (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-95
- Killian JA** (2003) Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett.* 555, 134-138
- Killian JA, von Heijne G** (2000) How proteins adopt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25, 429-434
- Krishnan MN, Bingham JP, Lee SH, Trombley P, Moczydlowski E** (2005) Functional role and affinity of inorganic cations in stabilizing the tetrameric structure of the KcsA K⁺ channel. *J Gen Physiol.* 126(3):271-83
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY** (1992) Primary structure and function of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362, 127-133
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahmann T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA** (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300, 1922-1926
- Lamb RA, Pinto LH** (1997) Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles? *Virology* 229,1-11
- Lu H, Marti T, Booth PJ** (2001) Proline Residues in Transmembrane α Helices Affect the Folding of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 308, 437-446
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH, Kaufman A** (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-49
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S** (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657-661
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH** (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414, 37-42
- MacKinnon R** (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350, 232-235
- Mehmel M** (2004) Studien zur Funktion von Kaliumkanalproteinen aus Viren Eukaryotischer Algen (Phycodnaviridae). Doktorarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Mouritsen OG, Bloom M** (1993) Models of lipid-protein interactions in membranes. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:145-71
- Mehmel M, Rothermel M, Meckel T, VanEtten JL, Moroni A, Thiel G** (2003) Possible function for virus encoded K⁺ channel Kcv in the replication of chlorella virus PBCV-1. *FEBS Letters* 552, 7-11

- Miller C** (1992) Ion channel structure and function. *Science* 258, 240-241
- Minor DL Jr, Masseling SJ, Jan YN, Jan LY** (1999) Transmembrane structure of an inwardly rectifying potassium channel. *Cell* 96(6):879-91
- Moroni A, Viscomi C, Sangiorgio V, Pagliuca C, Meckel T, Horvath F, Gazzarrini S, Valbuzzi P, Van Etten JL, DiFrancesco D, Thiel G** (2002) The short N-terminus is required for functional expression of the virus-encoded miniature K⁺ channel Kcv. *FEBS Lett.* 530, 65-69
- Neher und Sakmann** (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle muscle fibres. *Nature* 260, 799-802
- Neupärtl M, Meyer C, Woll I, Frohns F, Kang M, Van Etten JL, Kramer D, Hertel B, Moroni A, Thiel G** (2008) Chlorella viruses evoke a rapid release of K⁺ from host cells during the early phase of infection. *Virology* 372(2):340-8
- Ogielska EM, Aldrich RW** (1999) Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation. *J Gen Physiol.* 113(2):347-58
- O'Neil KT, DeGrado WF** (1990) A Thermodynamic Scale for the Helix-Forming Tendencies of the Commonly Occurring Amino Acids. *Science* 250: 646-651
- Pagliuca C, Goetze TA, Wagner R, Thiel G, Moroni A, Parcej D** (2007) Molecular properties of Kcv, a virus encoded K⁺ channel. *Biochemistry* 46(4):1079-90
- Parsegian A** (1969) Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221, 844-846
- Peinelt C, Apell HJ** (2004) Time-resolved charge movements in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biophys. J.* 86(2):815-24
- Perozo E, Cortes DM, Cuello LG** (1998) Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K⁺ channel studied by EPR spectroscopy. *Nat Struct Biol.* 5(6), 459-469
- Perozo E, Cortes DM, Cuello LG** (1999) Structural Rearrangements Underlying K⁺-Channel Activation Gating. *Science* 285: 73-78
- Petersen KR, Nerbonne JM** (1999) Expression environment determines K⁺ current properties: Kv1 and Kv4 α -subunit-induced K⁺ currents in mammalian cell lines and cardiac myocytes. *Pflügers Arch.* 437, 381-392
- Planque MRR, Killian JA** (2003) Protein/lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Molecular Membrane Biology* 20, 271-284
- Plugge B, Gazzarrini S, Nelson M, Cerana R, Van Etten JL, Derst C, DiFrancesco D, Moroni A, Thiel G** (2000) A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science* 287, 1641–1644
- Prasher DC** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233
- Ramos J, Aligo R, Haro R, Rodriguez-Navarro A** (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176, 249-252
- Rapedius M, Fowler PW, Shang L, Sansom MS, Tucker SJ, Baukrowitz T** (2007) H Bonding at the Helix-Bundle Crossing Controls Gating in Kir Potassium Channels. *Neuron* 55(4):602-14
- Rodríguez-Navarro A** (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469, 1–30
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sansom MS, Shrivastava IH, Bright JN, Tate J, Capener CE, Biggin PC** (2002) Potassium channels: structures, models, simulations. *BBA* 1565(2):294-307
- Santos JS, Grigoriev SM, Montal M** (2008) Molecular template for a voltage sensor in a novel K⁺ channel. III. Functional reconstitution of a sensorless pore module from a prokaryotic Kv channel. *J Gen Physiol.* 132(6):651-66

- Schachtmann DP, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF** (1992) Expression of an inwardrectifying potassium channel by the *Arabidopsis KAT1* cDNA. *Science* 258:1654–1658
- Schroeder I, Hansen UP** (2007) Saturation and microsecond gating of current indicate depletion-induced instability of the MaxiK selectivity filter. *J Gen Physiol.* 130(1):83-97
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C** (1992) *Science* 256; 663–665
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacrout F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C** (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256, 663-665
- Shrivastava IH, Tieleman DP, Biggin PC, Sansom MS** (2002) K^+ versus Na^+ ions in a K channel selectivity filter: a simulation study. *Biophys J.* 83(2):633-45
- Swartz KJ** (2004) Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat. Rev. Neuroscience* 5(12):905-16
- Tan Q, Shim JW, Gu LQ** (2010) Separation of heteromeric potassium channel Kcv towards probing subunit composition-regulated ion permeation and gating. *FEBS Lett.* 584(8):1602-8
- Tang W, Ruknudin A, Yang WP, Shaw SY, Knickerbocker A, Kurtz S** (1995) Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K^+ channel in yeast. *Mol Biol Cell.* 6(9):1231-40
- Tayefeh S, Kloss T, Thiel G, Hertel B, Moroni A, Kast SM** (2007) Molecular dynamics simulation of the cytosolic mouth in Kcv-type potassium channels. *Biochemistry* 46(16):4826-39
- Tayefeh S, Kloss T, Kreim M, Gebhardt M, Baumeister D, Hertel B, Richter C, Schwalbe H, Moroni A, Thiel G, Kast SM** (2009) Model development for the viral Kcv potassium channel. *Biophys J.* 96(2):485-98
- Taylor JR** (1996) An Introduction to Error Analysis: The Study of Uncertainties in Physical Measurements
- Thompson AN, Posson DJ, Parsa PV, Nimigeen CM** (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *PNAS* 105(19):6900-5
- Zaks-Makhina E, Kim Y, Aizenman E, Levitan ES** (2004) Novel neuroprotective K^+ channel inhibitor identified by high throughput screening in yeast. *Molecular Pharmacology* 65, 214-9
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R** (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657-661
- VanDongen AMJ** (2004) K^+ channel gating by an affinity-switching selectivity filter. *PNAS* 101, 3248-3252
- Van Etten JL, Graves MV, Müller DG, Boland W, Delaroque N** (2002) Phycodnaviridae - large DNA algal viruses. *Arch. Virol.* 147, 1479-1516
- Yau WM, Wimley WC, Gawrisch K, White SH** (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37, 14713-14718
- Yu SP, Kerchner GA** (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *NeurosciRes* 52, 612-617
- Zheng J und Sigworth FJ** (1997) Selectivity Changes during Activation of Mutant Shaker Potassium Channels. *J. Gen. Physiol.* 110, 101-117

9 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mit denen ich im Laufe der letzte drei Jahre eine so angenehme und produktive Zeit erleben durfte. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Gerhard Thiel, für die vielen spannenden Projekte, die so vielfältig und abwechslungsreich waren. Für das stetige Interesse an meiner Arbeit, auch wenn es mal nur schleppend und über Umwege voranging. Für die Freiheiten und Möglichkeiten, die ich bei der Durchführung meiner Projekte genießen durfte. Für den freundschaftlichen und lockeren Umgang, der maßgeblich zur Motivation und zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat. Und ganz besonders für die Rückendeckung bei den Problemen abseits der Wissenschaft.

Prof. Dr. Adam Bertl, für die Einführung in die große weite Welt der Hefen, für die freundliche und geduldige Art stets mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und für die Übernahme des Koreferates.

Dr. Brigitte Hertel, meiner Zimmergenossin und Lieblings-Kollegin in der AG-Thiel, für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen stets hilfreichen wissenschaftlichen aber auch schönen privaten Gespräche und die unendlich große Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Stefan Kast, für die wegweisenden Hilfen in der finalen Phase der Arbeit und für die große Geduld bei allen thermodynamischen, statistischen, integrierenden, modellierenden, homologiesimulierenden und fehlerfortplanzenden Fragestellungen.

Der immer größer werdenden AG-Thiel-Gemeinschaft mit allen aktiven und allen Ex-Mitgliedern, für die drei wunderschönen Jahre, den stets freundschaftlichen und unkomplizierten Umgang miteinander, die intensiven Kicker-Duelle und die vielen schönen Grill-, Poker-, Pizza-, Feuerzangenbowlen und Videoabende abseits des Laboralltags.

Karl Schuller und dem gesamten Team aus der Werkstatt, für die schnelle und kompetente Hilfe wenn der Computer mal wieder streikte oder der Patchplatz aufgerüstet werden mußte.

Ein ganz besonders großes Dankeschön gilt meiner **Mutter**, die mir während meiner gesamten Ausbildung mit Rat und Tat zur Seite stand und mir während dieser Zeit in jeglicher Weise den Rücken gestärkt hat und meinen **Schwiegereltern**, für deren vielseitige Unterstützung und Hilfsbereitschaft in den vergangenen Jahren, die mir vieles erleichtert haben.

Mein größter Dank gilt meiner Frau **Steffi**, die mich ermutigt hat diese Herausforderung anzunehmen und ohne deren beständige Unterstützung diese Doktorarbeit nie geschrieben worden wäre.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Dirk Baumeister, Darmstadt, den 20.04.2010

11 Anhang

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Thiel G, Baumeister D, Schroeder I, Kast S, Van Etten J, Moroni A (2010) Small Viral K⁺ Channels are Tools for Understanding Basic Structure and Function Relations. *BBA Biomembranes* (in press)

Tayefeh S, Kloss T, Kreim M, Gebhardt M, Baumeister D, Hertel B, Richter C, Schwalbe H, Moroni A, Thiel G, Kast SM (2009) Model development for the viral Kcv potassium channel. *Biophys J.* 96(2):485-98.

Hertel B, Tayefeh S, Kloss T, Hewing J, Gebhardt M, Baumeister D, Moroni A, Thiel G, Kast SM (2009) Salt bridges in the miniature viral channel Kcv are important for function. *Eur Biophys J.*

Balss J, Papatheodorou P, Mehmehl M, Baumeister D, Hertel B, Delaroque N, Chatelain FC, Minor DL Jr, Van Etten JL, Rassow J, Moroni A, Thiel G (2008) Transmembrane domain length of viral K⁺ channels is a signal for mitochondria targeting. *PNAS* 105(34):12313-8

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
CLSM	Confokale Laser Scanning Mikroskopie
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukleotide
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EsV-1	Ectocarpus siliculosus Virus
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (aus <i>Aequoria victoria</i>)
HEK293	<i>human embryonic kidney cells</i> (Zelllinie 293)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
I _i	instantaner Strom
I _{ss}	stationärer (engl. <i>steady-state</i>) Strom
I	Strom
LB	Luria Bertani-Medium
n	Anzahl der Versuchswiederholungen
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Porenregion
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria Chlorella</i> Virus 1

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase chain reaction
Pfu	Enzym aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
Tab.	Tabelle
Taq	Enzym aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris buffert Saline
TM	Transmembran (-region)
U	Unit
mV	Millivolt
V	Spannung
wt	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis für häufig erwähnte Kanäle:

BK	<i>Large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels</i>
EAG	<i>Ether-à-Gogo Kanäle</i>
KcsA	Kaliumkanal aus <i>Streptomyces lividans</i>
Kcv	Kaliumkanal aus Chlorellavirus
Kesv	Kaliumkanal aus Ectocarpusvirus
Kir	Kaliumkanäle (<i>inward rectifier</i>)
MthK	Kaliumkanal aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
Kv	Kaliumkanäle (<i>voltage gated</i>)
KirBac1.1	Kaliumkanal aus <i>Burkholderia pseudomallei</i>

Lebenslauf:**Persönliche Daten**

Name:	Dirk Baumeister
Anschrift:	Sterngasse 113 64347 Griesheim Telefon: 06155-816565 E-Mail: dirk54@gmx.de
Geburtsdatum/-ort:	04. März 1979, Wesel
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

08.1985 bis 06.1989	Grundschule am Mühlenweg, Wesel
08.1989 bis 06.1998	Konrad-Duden-Gymnasium, Wesel Abschluss: Abitur

Zivildienst

01.02.1999 bis 29.02.2000	Radiologische Abteilung im Evangelischen Krankenhaus Wesel
---------------------------	---

Studium

10.2000 – 08.2006	Technische Universität Darmstadt Studium Biologie Vertiefungsfächer im Hauptstudium: <ul style="list-style-type: none"> • Tierphysiologie • Molekulare Zell- und Entwicklungsbiologie • Pflanzenphysiologie
03.2003	Vordiplom
02.2005 bis 04.2005	Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main Forschungspraktikum Thema: „Axon Guidance bei Vertebraten“
23.11.2005 – 20.07.2006	TU Darmstadt AG Thiel – Membrane Biophysics Diplomarbeit Thema: „Struktur-Funktions-Beziehung des viralen Kalium-Kanals Kcv“ Abschluss: Diplom-Biologe (Note 1,0 mit Auszeichnung)
10.2006 bis voraussichtlich 05.2010	TU Darmstadt AG Thiel – Membrane Biophysics Promotion Thema: „Molekularbiologische und elektrophysiologische Charakterisierung viraler Ionenkanäle“